

UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN  
MECHANISMUS DES PHOTODYNAMISCHEN EFFEKTS

DISSERTATION  
VON  
ASTRID MICHELER

vorgelegt dem  
Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

1972



UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN  
MECHANISMUS DES PHOTODYNAMISCHEN  
EFFEKTS

Dissertation

von  
Astrid Micheler

vorgelegt dem  
Fachbereich Biologie  
der Freien Universität  
Berlin



Tag der mündlichen Prüfung: 7. 6. 1972

1. Referent: Prof. Dr. E. -R. Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. W. Stein

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit durch anregende Diskussionen und hilfreiche Mitarbeit möchte ich besonders Randolph Lochmann, Ingrid Pietsch, Petra und Uwe Reichert, Bernd Schaarschmidt, Lerke Scholing und Christa Umlauf sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre herzlich danken.

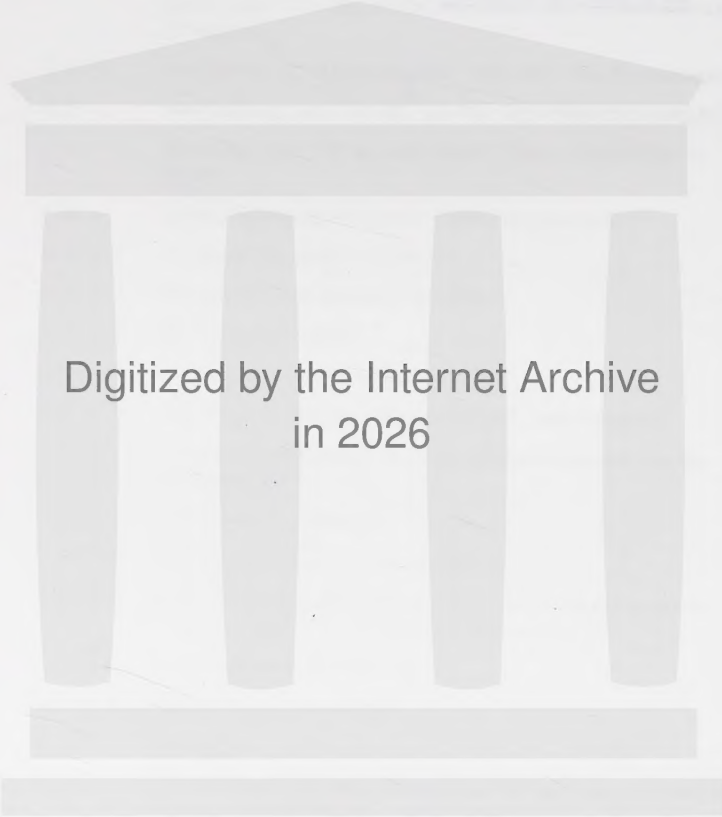


## Inhaltsverzeichnis

|                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. <u>Einführung</u>                                                         | 1     |
| 1. 1 Definition des photodynamischen Effekts                                 | 1     |
| 1. 2 Dunkelwirkung von Farbstoffen                                           | 5     |
| 1. 3 Hellwirkung von Farbstoffen (Effekt I)                                  | 13    |
| 1. 3. 1 Photodynamische Behandlung von Proteinen                             | 16    |
| 1. 3. 2 Photodynamische Veränderung von Nukleinsäuren                        | 17    |
| 1. 4 Physikochemischer Mechanismus der photodynamischen Oxidation (Effekt I) | 19    |
| 2. <u>Problemstellung</u>                                                    | 22    |
| 3. <u>Material und Methoden</u>                                              | 23    |
| 3. 1 Material                                                                | 23    |
| 3. 1. 1 Saccharomyces-Stämme                                                 | 23    |
| 3. 1. 2 Thiopyronin (TP)                                                     | 23    |
| 3. 1. 3 Sonstige Substanzen und Zusammensetzungen von Lösungen               | 25    |
| 3. 2 Methoden                                                                | 25    |
| 3. 2. 1 Verwendete Geräte                                                    | 25    |
| 3. 2. 2 Strahlenquellen                                                      | 26    |
| 3. 2. 3 Durchführung der Versuche                                            | 26    |
| 4. <u>Ergebnisse und Diskussion</u>                                          | 32    |
| 4. 1 Inaktivierungsversuche mit Saccharomyceszellen                          | 32    |
| 4. 1. 1 Einfluß der TP-Konzentration                                         | 32a   |
| 4. 1. 1. 1 Variation der Vorinkubationszeit                                  | 32a   |
| 4. 1. 1. 2 Variation der TP-Konzentration                                    | 34    |
| 4. 1. 2 Einfluß der Inkubations- und Bestrahlungstemperatur                  | 37    |
| 4. 1. 3 Einfluß der Zuchtbedingungen und des Alters der Vorkultur            | 40    |

|         |                                                                                                                          |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2     | Aufnahme von TP in Saccharomyceszellen                                                                                   | 41 |
| 4.2.1   | TP-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit                                                                                 | 41 |
| 4.2.2   | Aufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur                                                                              | 43 |
| 4.2.3   | Aufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration der TP-Lösung                                                             | 44 |
| 4.2.3.1 | Kinetik der Aufnahme                                                                                                     | 44 |
| 4.2.3.2 | Abhängigkeit der Konzentration an Farbstoff in der Zelle ( $c_i$ ) von der Konzentration der Inkubationslösung ( $c_a$ ) | 45 |
| 4.2.4   | Aufnahme in Abhängigkeit von der Wachstumsphase                                                                          | 46 |
| 4.3     | Verteilung von TP- $H^3$ in der Saccharomyceszelle                                                                       | 47 |
| 4.4     | Bindung von TP an zelluläre Makromoleküle in vitro                                                                       | 50 |
| 4.4.1   | Spektrophotometrische Untersuchungen                                                                                     | 51 |
| 4.4.1.1 | Bindung an native DNS                                                                                                    | 51 |
| 4.4.1.2 | Bindung an degradierte DNS                                                                                               | 54 |
| 4.4.1.2 | Bindung an tRNS                                                                                                          | 54 |
| 4.4.1.4 | Bindung an denaturierte DNS                                                                                              | 55 |
| 4.4.1.5 | Bindung an PolyA, PolyU, PolyC und PolyAG                                                                                | 56 |
| 4.4.1.6 | Zusammenfassung der Bindungsversuche an Nukleinsäuren                                                                    | 56 |
| 4.4.1.7 | Bindung an Albumin                                                                                                       | 60 |
| 4.4.1.8 | Bindung an Hefe-Ribosomen                                                                                                | 60 |
| 4.4.2   | Hitzedenaturierungsversuche mit unbestrahlten und bestrahlten TP-DNS-Komplexen                                           | 61 |
| 4.4.2.1 | Unbestrahlte Komplexe                                                                                                    | 61 |
| 4.4.2.2 | Bestrahlte Komplexe                                                                                                      | 62 |
| 4.4.3   | Dialyse                                                                                                                  | 62 |
| 4.5     | Dunkel- und Hellwirkung von TP auf ein zellfreies Protein synthetisierendes System                                       | 64 |
| 4.5.1   | Dunkelwirkung von TP auf das Gesamtsystem                                                                                | 65 |
| 4.5.2   | Photodynamische Wirkung auf das Gesamtsystem und seine Komponenten                                                       | 66 |
| 4.6     | Photodynamische Inaktivierung von RNS- und Proteinsynthese in vivo                                                       | 69 |

|                                                                                                         | <u>Seite</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.7      Einfluß von TP in Gegenwart und in Abwesenheit<br>von sichtbarem Licht auf die Adenin-Aufnahme | 77           |
| 5. <u>Zusammenfassende Diskussion</u>                                                                   | 81           |
| <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                             | 87           |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41550805\\_0007](https://archive.org/details/IA41550805_0007)

## 1. EINFÜHRUNG

### 1.1 Definition des photodynamischen Effekts

Die biologisch wirksamen Strahlen kann man nach ihrer molekularen Aktivität in drei Gruppen einteilen: ionisierende Strahlen, UV- und sichtbares Licht.

Zu den ionisierenden Strahlen zählen neben allen Korpuskularstrahlen die kurzwelligen elektromagnetischen Wellen, die  $\gamma$ - und Röntgenstrahlen und der kurzwellige Anteil des UV-Lichtes.

Diese Strahlen sind so energiereich, daß alle getroffenen Materieteilchen der Zelle ionisiert und radikalisiert werden können. Da 70% der normalen Zelle aus Wasser besteht, wirken sie vornehmlich primär auf Wassermoleküle, die teilweise in  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H^\cdot$ ,  $e^-$ ,  $H_2O_2$  und (bei Gegenwart von  $O_2$ ) in  $H_2O^\cdot$  umgewandelt werden. Sekundär wirken dann die primären Bestrahlungsprodukte des Wassers, soweit sie nicht mit sich selbst reagieren, auf andere Zellsubstanzen verändernd ein, wobei der relevante biologische Schaden an der DNS (Einzel- und Doppelstrangbrüche, Veränderungen bzw. Zerstörungen der Basen) gesetzt wird. Die zu einem geringen Prozentsatz auftretenden direkten Treffer an der DNS verursachen meist irreparable lethale Doppelstrangbrüche (vgl. z.B. SZYBALSKI 1967).

Das in den üblichen Hg-Entladungslampen erzeugte UV-Licht (maximale Energie bei ca.  $254\text{ m}\mu$ ) wirkt nicht ionisierend. Es erzeugt aber in Zellbestandteilen, die diese Strahlen absorbieren, in Nukleinsäuren (Absorptionsmaximum  $260\text{ m}\mu$ ) und in wesentlich geringerem Ausmaß in Proteinen (Maximum  $280\text{ m}\mu$ ), angeregte Zustände, die im Falle der Nukleinsäuren zu starken Veränderungen der Basen (Dimerisierung, Wasseranlagerung, Desaminierung) führen.

Die Energie des sichtbaren Lichtes kann nur in Zellen einen Effekt erzielen, in denen Substanzen vorliegen, die diese Energie absorbie-

ren können; d. h. es müssen Farbstoffe vorhanden sein. Als Beispiel für die vielseitige Wirkung des sichtbaren Lichtes in der Natur seien hier nur die Vorgänge der Photosynthese, der Photoreaktivierung, des Sehvorganges, an Phototropismus, Phototaxis und Photomorphogenese erinnert. Allerdings besitzen sehr viele lebende Systeme, hauptsächlich Mikroorganismen, nur geringe Mengen an farbigen Verbindungen, so daß die Quantenstrahlen mit Wellenlängen oberhalb von  $300\text{ m}\mu$  kaum absorbiert werden.

In der Regel wirkt die Absorption von sichtbarem Licht an natürlichen farbigen Zellkomponenten nicht inaktivierend oder schädigend auf die Zellen. Es kommen aber auch unter natürlichen Bedingungen "Unfälle" vor, bei denen zelleigene Farbstoffe im Zusammenwirken mit Licht eine zerstörende Wirkung auf Zellen ausüben. So kann z. B. die von Chlorophyll unter besonderen Bedingungen (z. B.  $\text{CO}_2$ -Mangel) absorbierte Energie zur Zerstörung der Blätter führen (FRANCK und FRENCH 1941; weitere Beispiele bei SPIKES 1968).

Die inaktivierende Wirkung des sichtbaren Lichtes tritt aber in der Regel nur dann auf, wenn zusätzliche, meist nicht natürlich vorkommende Farbstoffe vorhanden sind. Die verändernde Wirkung von sichtbarem Licht in Gegenwart von Farbstoffen auf Zellen oder Zellkomponenten nennt man photodynamischen Effekt oder photodynamische Erscheinung (TAPPEINER und JODLBAUER 1907).

Das Zusammenwirken von Farbstoffen mit sichtbarem Licht ist schon sehr lange bekannt. Bereits 1888 wurde zum ersten Mal darüber berichtet (MARCACCI 1888). Die erste systematische Untersuchung begann zu Beginn dieses Jahrhunderts durch RAAB (1900), später durch v. TAPPEINER und JODLBAUER (1904, 1907). Die beiden letztgenannten veröffentlichten bereits 1907 ein zusammenfassendes Buch über die photodynamische Erscheinung", das bereits bemerkenswert viele De-

tailkenntnisse über diesen Effekt vermittelte.

Die bis heute über den photodynamischen Effekt erschienene Literatur ist sehr umfangreich. Sie ist z. B. in folgenden Übersichtsarbeiten zusammengefaßt: BLUM 1941; SANTAMARIA 1960; SPIKES und STRAIGHT 1967; SPIKES 1968, SPIKES und LIVINGSTON 1969; LOCHMANN und MICHELER 1972.

Seit den Untersuchungen von TAPPEINER und JODLBAUER (1904, 1907) wird unter photodynamischem Effekt oder photodynamischer Erscheinung die zerstörende Wirkung sichtbaren Lichts in Gegenwart von organischen Farbstoffen verstanden. Nach dieser Definition wirken Licht oder Farbstoff allein nicht inaktivierend, sondern nur ihr gleichzeitiges Zusammenwirken.

Nach heutigen Erkenntnissen weiß man jedoch, daß die meisten photodynamisch aktiven Farbstoffe durch ihre Bindungsfähigkeit an Zellkomponenten in höherer Konzentration auch im Dunkeln inaktivierend auf Stoffwechselprozesse wirken. Man muß demnach zwischen Dunkel- und Hellwirkung eines Farbstoffes unterscheiden.

Für die Hellwirkung gibt es unterschiedliche Vorstellungen, welche farbstoffsensibilisierten Photo-Reaktionen zum "photodynamischen Effekt" hinzugezählt werden können. Zur Unterscheidung der einzelnen Möglichkeiten photodynamischer Reaktionen seien im folgenden die einzelnen Effekte mit römischen Ziffern benannt (vgl. LOCHMANN und MICHELER 1972).

Nach BLUM(1941) und SPIKES (1968) sollte der Terminus "Photodynamischer Effekt" nur für die farbstoffsensibilisierten Photoreaktionen gelten, bei denen molekularer Sauerstoff gebraucht wird; d.h. nur für farbstoffsensibilisierte Photooxidationen.

Dagegen wollen andere Autoren auch die sauerstoffunabhängigen farbstoffsensibilisierten Photoreaktionen als photodynamischen Effekt an-

sehen (SCHENCK, zitiert nach DELLWEG und OPREÉ 1966). Sie werden hier unter Effekt III zusammengefaßt. Als  $O_2$ -unabhängig wirksame Verbindungen sind bisher die Furocumarine bekannt (z. B. Psoralen, Bergapten), die nach Anlagerung an Nukleinsäuren unter der Einwirkung von Quantenstrahlen, die im Grenzbereich zwischen sichtbarem Licht und UV-Licht liegen (ca. 365 m $\mu$ ), mit Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren Verbindungen eingehen, die den UV-induzierten Pyrimidindimeren ähnlich sind (Ausbildung von  $C_4$ -Cycloadditionen und Querverbindungen der DNS-Stränge) (z. B. DALL'ACQUA et al. 1971).

Die meisten nicht-physiologischen farbstoffsensibilisierten Lichtreaktionen in biologischen Systemen sind jedoch abhängig von der Gegenwart von  $O_2$ . Bei diesen Reaktionen sind wieder 2 Arten des Effekts unterscheidbar, die früher mit "Innenwirkung" und "Außenwirkung" bezeichnet wurden (GEISLER 1959; METZNER 1924; LOCHMANN et al. 1965 b; LOCHMANN und STEIN 1968a). Diese Bezeichnungen sind aber nicht ganz exakt, da sich möglicherweise der primäre Effekt der "Außenwirkung" auch innerhalb der Zelle abspielen kann.

Bei dem früher als "Innenwirkung" bezeichneten Effekt, der hier als "Effekt I" bezeichnet werden soll, muß der Farbstoff in die Zelle eindringen, sich dort an Zellkomponenten anlagern, die Energie des sichtbaren Lichtes absorbieren und auf die angelagerten Verbindungen übertragen, die dadurch verändert werden. Der Farbstoff bleibt während der photodynamischen Reaktion unverändert - zumindest bewirkt seine mögliche eigene Veränderung (Ausbleichung) keine Inaktivierung oder Veränderung von Zellkomponenten. (Oft wird eine photodynamische Reaktion, bei der der Sensibilisator selbst verändert wird, als "photoinduzierte Reaktion" bezeichnet (SPIKES und LIVINGSTON 1969)).

Bei dem früher als "Außenwirkung" bezeichneten photodynamischen Effekt, der hier "Effekt II" genannt werden soll, wird entweder außerhalb der Zelle der Farbstoff durch die Einwirkung des sicht-

baren Lichtes so verändert, daß er selbst oder abgespaltene Teile verändernd auf Zellkomponenten wirken und so den Stoffwechsel beeinflussen. Eine vorherige Bindung an Zellkomponenten ist nicht Voraussetzung für die Wirkung (vgl. hierzu die Wirkung von Eosin, LOCHMANN und STEIN 1968a).

Es ist möglich, daß ein Farbstoff auch nach beiden Mechanismen (I und II) wirksam wird. Das trifft offensichtlich für Eosin zu.

In der vorliegenden Arbeit wird über die photodynamische Wirkung von Thiopyronin (TP) berichtet (vgl. Abb. 3). Wie die meisten der photodynamisch aktiven Farbstoffe wirkt auch TP nach Effekt I. Das bedeutet, daß TP von der Zelle aufgenommen und akkumuliert werden muß. Bindung an Zellkomponenten gewährleistet die Übertragung der Lichtenergie auf das Substrat, das dadurch verändert wird.

## 1.2 Dunkelwirkung von Farbstoffen

Da die Dunkelwirkung von Farbstoffen wichtige Hinweise auf den Angriffsort der Hellwirkung liefern kann, sind Studien über die Bindungsverhältnisse von Farbstoffen an biologisch wichtige Makromoleküle (z. B. Nukleinsäuren, Proteine) und über deren daraus resultierende biologische Veränderung wichtige Voraussetzung für die Aufklärung des Mechanismus des photodynamischen Effekts und seiner biologischen Wirksamkeit.

Bindung an Nukleinsäuren: Über die Bindung photodynamisch sehr aktiver Farbstoffe an Nukleinsäuren liegen nur wenige Aussagen vor, da bisher die Bindungseigenschaften hauptsächlich solcher Farbstoffe eingehend untersucht wurden, von denen man bereits seit längerer Zeit wußte, daß ihre Dunkeleinwirkung auf Organismen zur Verringerung der Überlebensfähigkeit und zur Steigerung der Mutationsrate führt. Da zumindest die beobachtete Steigerung der Mutationsrate, vor allem durch Acridine, die DNS als den Hauptangriffsort der Dun-

kelwirkung vermuten ließ, wurde die Bindungsfähigkeit einzelner Acridine und die Art dieser Bindung an Nukleinsäuren Gegenstand vieler Experimente. Die gefundenen Ergebnisse dienen auch der Aufklärung des photodynamischen Effekts. Man kann durch Vergleich von Dunkel- und Hellwirkung, aus Inaktivierungs- und Mutationsexperimenten unter Variation verschiedener Parameter erste Rückschlüsse auch auf die Bindungseigenschaften photodynamisch sehr aktiver Farbstoffe an Zellkomponenten ziehen. Ihre genauere Untersuchung am Beispiel von TP ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im folgenden seien die beiden Bindungsarten von Farbstoffen mit Nukleinsäuren und die dadurch entstehenden Komplexe sowie die einhergehenden strukturellen Nukleinsäure-Veränderungen kurz beschrieben.

In wässriger Lösung können planare Farbstoffe, z. B. Acridine, entweder einzeln oder - meist bei höheren Konzentrationen - als Dimere oder höhere Aggregate vorliegen. Der Übergang von der Monomer-Form in die Aggregat-Form wird von Verschiebungen des Absorptionsspektrums zu kürzeren Wellenlängen hin begleitet.

Analoge spektrale Verschiebungen können bei Zugabe von unterschiedlichen Nukleinsäurekonzentrationen zu Acridinlösungen beobachtet werden (MICHAELIS 1947). Bei niedrigem Verhältnis von gebundenem Farbstoff zu NS-Phosphat (im folgenden =  $r$  genannt) erscheint bei einigen Nukleinsäuren eine  $\alpha$ -Bande, die dem gebundenen Monomer entspricht (Rotverschiebung). Durch Zunahme von  $r$  verlagert sich das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen hin (Blauverschiebung) und es entsteht eine  $\beta$ -Bande, die den gebundenen Dimeren zugeordnet wird. Weitere Erhöhung von  $r$  bis zur Sättigung wird bei einigen Polymeren von einer erneuten Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen begleitet ( $\gamma$ -Bande, gebundene Aggregate).

Die spektralen Verschiebungen sind von energetisch zu unterscheidenden Bindungsarten begleitet (PEACOCKE und SKERRETT 1956). Die zuerst eintretende Kombination entspricht einer starken Bindung der

Monomere und zeichnet sich durch spezifische Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Nukleinsäurebasen aus.

Im Falle doppelsträngiger Nukleinsäuren schieben sich die planaren Farbstoffringe bei gleichzeitiger Entwindung der DNS-Helix um wahrscheinlich  $12^{\circ}$  (FULLER und WARING 1964; andere Theorie: PAOLETTI und LePECQ 1971) zwischen benachbarte Basenpaare, deren Abstand voneinander dadurch verdoppelt wird (Abb. 1 und 2). Diese Innenbindung wird nach LERMAN (1961) als Interkalation bezeichnet. Wie Abb. 1 zeigt, liegt die Farbstoffebene senkrecht zur Helixachse und parallel zu den Ebenen der Basen (LERMAN 1963, 1964; TAKESADA et al. 1970).

Im Falle einzelsträngiger Nukleinsäuren lagern sich die Farbstoffmoleküle wahrscheinlich zwischen die benachbarten Basen desselben Stranges, indem sie den Abstand der getrennten Basen auf die doppelte Länge erhöhen. Nach dem "modifizierten Interkalationsmodell" von PRITCHARD, BLAKE und PEACOCKE (1966), das ursprünglich als Bindungsmodell für doppelsträngige Nukleinsäure vorgeschlagen wurde, schwingt das negative Sauerstoffatom der zwischen den getrennten Basen liegenden Phosphorgruppen in die Innenseite der Kette und tritt in Wechselwirkung mit einem positiv geladenen Ring-Atom des inserierten Farbstoffs (Abb. 1a, 2). Möglicherweise binden einige Farbstoffe nach diesem Mechanismus auch mit doppelsträngiger Nukleinsäure. Nach Absättigung der ersten Bindungsstelle (z. B. für den Proflavin-DNS-Komplex bei  $r = 0,22$ ) entsteht ein schwächerer Komplex, bei dem sich die positiven Farbstoffmoleküle an die negativen Phosphatreste der Nukleinsäure binden (Außenbindung) (Abb. 2). Analog der Tendenz zur Selbstaggregation in Lösung neigen Farbstoffmoleküle bei der Bindung an die Außenseite eines Polymers dazu, sich an Stellen zu setzen, die schon gebundenen Molekülen benachbart sind, um mit ihnen in starke Wechselwirkung zu treten. Die daraus resultierende Aufstockung der planaren Farbstoffmoleküle senkrecht zur Helix-

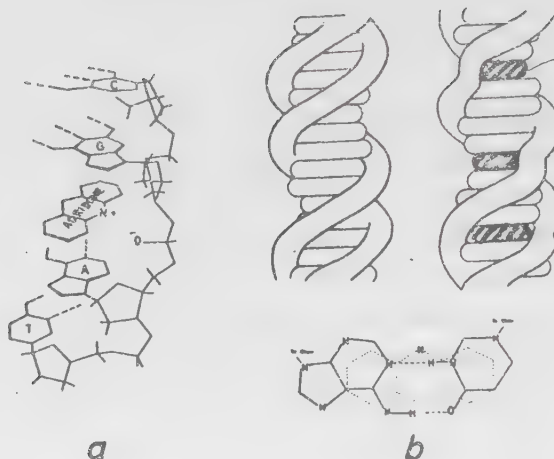


Abb. 1 Interkalationsmodell von PRITCHARD, BLAKE und PEACOCKE (1966) (a) und von LERMAN (1961) (b). DNS-Basen ohne Schraffur, Farbstoffmoleküle schraffiert.

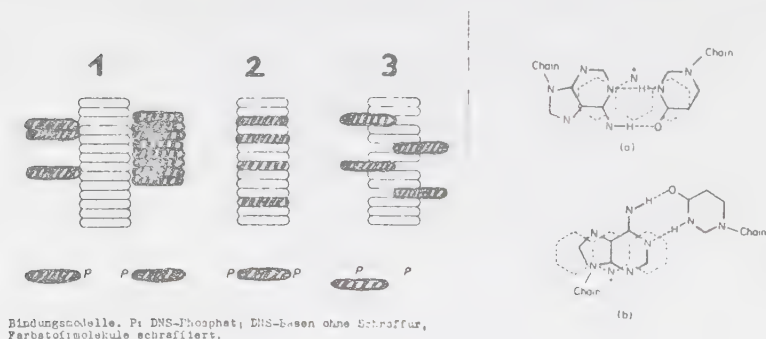


Abb. 2 Bindungsmodelle

- links:
- 1) Außenbindung: Farbstoff einzeln und als Dimer gebunden (linke Seite des Polymers) und Farbstoff-stacking (rechte Seite des Polymers).
  - 2) Innenbindung nach dem von LERMAN (1961) vorgeschlagenen Interkalationsmechanismus.
  - 3) Innenbindung nach dem von PRITCHARD, BLAKE und PEACOCKE (1966) vorgeschlagenen modifizierten Interkalationsmodell.

Der rechte Teil der Abb. zeigt die relative Position eines Farbstoffmoleküls und eines Basenpaares nach Interkalation entsprechend dem von LERMAN (a) bzw. dem von PRITCHARD und Mitarbeitern (b) vorgeschlagenen Modell.

achse wird als "stacking" bezeichnet (u. a. BRADLEY und WOLF 1959; STONE und BRADLEY 1961).

Eine wichtige Rolle für Stöchiometrie und Struktur des Komplexes spielen die Konfiguration des bindenden Farbstoffmoleküls und seine chemischen Eigenschaften (Basizität, Elektronenverteilung) einerseits sowie die Struktur und den sich daraus ergebenden physikochemischen Eigenschaften der Nukleinsäure (Basenzusammensetzung, Anzahl helicaler Bereiche, Flexibilität, Ladung) andererseits. So ist auch das Ausmaß der Innen- sowie der Außenbindung und die Gleichgewichtsverteilung der Bindungsarten sehr abhängig von den Reaktionsbedingungen, wie z. B. vom Ionenmilieu und der -stärke und von der Temperatur (u. a. LI und CROTHERS 1969 a, b; LIERSCH und HARTMANN 1965; DRUMMOND et al. 1965 ; CHAMBRON et al. 1966a; ICHIMURA et al. 1969).

Die Farbstoffinterkalation in die native DNS führt zu erhöhter Starrheit und Festigkeit des Moleküls, was sich in der Erhöhung der Viskosität und in der Erniedrigung des Sedimentationskoeffizienten gegenüber freier nativer DNS widerspiegelt (LERMAN 1961).

Die mit der Interkalationsbindung einhergehende Abnahme der freien Energie des Komplexes zeigt sich in der Erhöhung des Schmelzpunktes gebundener gegenüber freier DNS (u. a. GERSCH und JORDAN 1965, FINKELSTEIN und WEINSTEIN 1967).

Es konnte gezeigt werden, daß - zumindest für Acridine - pyrimidinreiche Interkalationsbindungsstellen größere Affinität aufweisen als purinreiche (TUEBS et al. 1964; KLEINWÄCHTER und KOUDELKA 1964; GERSCH und JORDAN 1965; YAMABE 1969); ebenso besitzt die positiv überdrehte zirkuläre DNS größere Bindungsaffinität für den Farbstoff als entsprechende offene Formen (CRAWFORD und WARING 1967; BAUER und VINOGRAD 1968, 1970a, b).

Viele der Untersuchungen über die Farbstoffbindung an RNS (t-RNS, Virus RNS, synthetische RNS) hatten neben der Charakterisierung des Komplexes zum Ziel, die Struktur und biologische Funktion der betreffenden RNS-Arten näher zu beschreiben (BORISOVA et al. 1963; GROSJEAN et al. 1968; TAO et al. 1970; KAPULER 1971).

Weitere Einzelheiten über die Bindung von Farbstoffen an Nukleinsäuren sind z. B. in folgenden Übersichtsarbeiten zusammengestellt: BLAKE und PEACOCKE 1968; WARING 1968; LÖBER 1971; LOCHMANN und MICHELER 1972; oder in vielen Einzelreferaten, die z. B. in folgenden Büchern zusammengefaßt sind: Molecular Association in Biology (1968); Interaktionen bei Biopolymeren (1970).

Bindung an Proteine: Über die Bindung kationischer, TP strukturell ähnlicher Farbstoffe an Proteine liegen kaum Untersuchungen vor. Proteine können die Farbstoffe erst bei pH-Werten oberhalb ihres isoelektrischen Punktes binden. Die Bindung mit Proteinen kann bei kationischen Farbstoffen ähnlich wie bei ihrer Bindung mit Nukleinsäuren von einer Abnahme der Fluoreszenzintensität begleitet sein.

Bindung an Zellorganellen: Untersuchung der Farbstoffbindung an Zellorganellen, wie z. B. an Ribosomen, galten meist der Aufklärung der Konformation des komplexen Organells oder einzelner seiner Teile, im Falle der Ribosomen oft der Ermittlung der räumlichen Struktur der r-RNS im Ribosom.

Aufgrund theoretischer Betrachtungen (MORGAN und RHOADS 1965) oder durch vergleichende Untersuchungen wurde gezeigt, daß bei der Farbstoff-Ribosomen-Wechselwirkung der Farbstoff (zum größten Teil) mit der r-RNS und nicht mit dem Ribosomenprotein bindet und daß die Bindung an die r-RNS qualitativ mit der Bindung an andere Nukleinsäuren vergleichbar ist (FURANO et al. 1966; MIALL und WALKER 1967; PERMOGOROV und VASILYEV 1970).

Über die Bindung von Farbstoff an Mitochondrien bzw. die Aufnahme von Farbstoff in Mitochondrien liegen indirekte Befunde vor (s. unten). Die mitochondriale DNS hat aufgrund ihrer zirkularen überdrehten Struktur eine höhere Affinität für Farbstoffe als offene lineare DNS (z. B. BAUER und VINOGRAD 1970a).

Vor kurzem veröffentlichte Untersuchungen über die Bindung kationischer Farbstoffe an Mitochondrienmembranen zeigen, daß nur die mit Energie versorgten submitochondrialen Partikel sehr stark Farbstoff binden. (Mit Hilfe solcher Bindungsversuche sollen die mit der Energieübertragung einherlaufenden Konformationsänderungen der Mitochondrienmembranen analysiert werden) (Dell'ANTONE et al. 1972a,b).

#### Beeinflussung der Funktion von Zellbestandteilen nach Farbstoffbindung

Es soll hier kurz versucht werden, einige Fragestellungen hervorzuheben, die häufig Experimente zur Dunkelwirkung anregten.

Die zunehmende Aufklärung und Kenntnis der molekularen Vorgänge und Gesetzmäßigkeiten bei der Bindung der Acridine an Nukleinsäuren erlaubte Vorstellungen über die molekularen Grundlagen bekannter, durch Acridine induzierter Phänomene:

Das Interkalationsmodell initiierte die Diskussion über die molekularen Vorgänge bei der frame-shift-Mutation (CRICK et al. 1961; BRENNER et al. 1961; MAGNI 1963; MAGNI et al. 1964; PUGLISI 1967; LERMAN 1963; STREISINGER et al. 1966; IMADA et al. 1970, OKADA et al. 1970).

Die oft beschriebene durch Acridine verursachte Beeinflussung der Respirationsfähigkeit von Hefen sowie die selektive Hemmung der DNS- und RNS-Synthese in Mitochondrien (HEILPORN und LIMBOSCH 1971; SCHWAB et al. 1971), der bevorzugte Angriff des Kinetoplasten von Trypanosomen (z. B. GUTTMAN und EISENMAN 1965; STEINERT 1969) und des Episoms von E. coli (YAMAGATA und UCHIDA 1969) konnte auf die größere Affinität überdrehter zirkularer DNS gegenüber linearer DNS zurückgeführt werden.

Andere Untersuchungen sollten dazu beitragen, weitere wichtige Einzelheiten über den molekularen Mechanismus von Farbstoff-induzierter Mutation und Inaktivierung zu ergeben. So wurde z. B. die biologische Wirksamkeit von Farbstoffen *in vivo* (Mutagenität, Carcinogenität, antivirale und bakteriostatische Wirkung) mit ihren strukturellen und chemischen Eigenschaften (z. B. verschiedene Ringsysteme, verschiedene Substituenten, pKa-Werte) und ihren Fähigkeiten, mit Makromolekülen, z. B. Nukleinsäuren zu komplexieren, verglichen (u. a. ORGEL und BRENNER 1961; RIVA 1966; BALCAROVÁ et al. 1971; CHAN und BALL 1971).

Interessierte die funktionelle Beeinträchtigung von Nukleinsäuren nach Wechselwirkung mit Farbstoffen, wurde z. B. die Replikation und Transkription von Phagen-DNS *in vivo* (z. B. ALTMAN und LERMAN 1970) oder die Aminoacylierungsreaktion der t-RNS *in vitro* (z. B. WÉRENNE et al. 1966; LANDEZ et al. 1969; LURQUIN und BUCHET-MAHIEU 1971) beobachtet.

Die meisten Arbeiten, die die Hemmung von Enzymaktivitäten nach Farbstoffeinwirkung zum Gegenstand haben, beschreiben meist keinen Aktivitätsverlust der Enzyme, der durch Enzym-Farbstoffbindung verursacht wird, sondern eine Verminderung der Umsatzrate, die durch Farbstoff-Substrat Bindung verursacht wird (z. B. WARING 1964; NICHOLSON und PEACOCKE 1966; MEYER und SIMPSON 1969; ZYLLBER et al. 1969).

Obwohl in vielen Fällen noch unterschiedliche Vorstellungen über die molekularen Einzelheiten der Dunkelwirkung bestehen, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die Bindung an Nukleinsäure, speziell wahrscheinlich die Interkalation, zu starker Beeinträchtigung der Nukleinsäurefunktion führt. Die veränderte Struktur, Ladung und Flexibilität kann z. B. zur sterischen Behinderung der DNS oder RNS-Polymerasen führen, kann zur fehlerhaften Erkennung spezifischer Syn-

thetasen bei der Aminoacylierungsreaktion führen, zum fehlerhaften Ablauf der Proteinsynthese am Ribosom oder durch Stabilisierung der während der Replikation falsch gepaarten DNS-Regionen zu frameshift-Mutationen.

### 1.3 Hellwirkung von Farbstoffen (Effekt I)

Nachdem der photodynamische Effekt erkannt und beschrieben worden war (RAAB 1900, TAPPEINER und JODLBAUER 1907), wurden bald auch höhere Organismen (Mäuse, Frösche, Rinder, Menschen) gezielt mit Farbstoff und Licht behandelt (Einzelheiten siehe bei BLUM 1964 oder SPIKES 1968). Diese Arbeiten waren wichtig, um Material für die Beschreibung des photodynamischen Effektes zu liefern, brachten aber in der Regel keine wesentlichen Beiträge zur Aufklärung des Effektes. Dafür waren die Systeme zu komplex und die Wirkungen schwer durchschaubar.

Die heute mit multizellulären Organismen durchgeführten Untersuchungen haben meist einen praktischen Hintergrund: a) Es sollen die durch photodynamische Effekte hervorgerufenen, Menschen und Tiere schädigenden Wirkungen von Substanzen erkannt und damit eventuell ausgeschlossen werden. So wirkt z. B. Eosin, das früher als Beruhigungsmittel verabreicht wurde, stark photodynamisch. Es führte zu Haut- und Augenschäden, wenn die behandelten Personen dem Sonnenlicht ausgesetzt waren (vgl. FITZPATRICK et al. 1963). - Kosmetika müssen heute auf mögliche photodynamische Wirksamkeit untersucht werden, ehe sie in den Handel kommen (TAPPEN 1966). - Auch ist die Carcinogenität des photodynamischen Effektes z. B. bei Benzpyrenen und Benzacridinen (vgl. SANTAMARIA 1960; SANTAMARIA et al. 1966; EPSTEIN et al. 1964; CROMWELL 1965) von großem praktischem Interesse.

b) Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen, die die inaktivierende Wirkung des photodynamischen Effektes ausnutzen, um z. B. Heilungen von Hautkrankheiten, u. a. von Hauttumoren, zu versuchen. Über Heilung von Hauttumoren mit Farbstoff und Licht berichteten bereits JESIONEK und v. TAPPEINER 1905 (zitiert aus TAPPEINER und JODLBAUER 1907). Solche Arbeiten wurden in jüngster Zeit wieder aufgegriffen. BERG und JUNGSTAND konnten erfolgreich Mäusetumore mit Farbstoff und Licht bekämpfen (BERG 1964; BERG und JUNGSTAND 1966). Auch die heilende Wirkung der Furocumarine bei Hautkrankheiten ist schon sehr lange bekannt.

Neben der phänomenologischen Beschreibung der Wirkung des photodynamischen Effekts auf Einzeller und Viren gibt es viele Arbeiten, die - oft indirekt - Aussagen über den biologisch relevanten Angriffsort des photodynamischen Effekts in der Zelle machen.

So unterscheidet sich z. B. die mutationsauslösende Wirkung des photodynamischen Effekts bei Hefen, Bakterien und Viren. Während bei verschiedenen Hefestämmen eine nur sehr geringe oder gar keine Erhöhung der Mutationsrate nach Einwirkung von TP und Licht festgestellt wurde (LOCHMANN et al. 1964; MARQUARDT und LAER 1966) induzierten TP und andere - hauptsächlich schon im Dunkeln stark mutagen wirkende - Farbstoffe bei Bakterien Mutationen: Die höchsten Mutationsraten traten nach photodynamischer Behandlung von Phagen auf (BÖHME und WACKER 1963; NAKAI und SAEKI 1964; RITCHIE 1965; BRENDDEL und KAPLAN 1967; BRENDDEL 1968; CALBERG-BACQ et al. 1968).

Aus diesen Untersuchungen, die zeigten, daß bei Hefen und zum Teil auch bei Bakterien die Mutationsrate im Verhältnis zur Inaktivierungsrate sehr klein ist, wurde geschlossen, daß die Zelle durch einen plasmatischen Schaden bereits so stark inaktiviert wird, daß ein - zumindest wohl bei Bakterien vorhandener - genetischer Schaden nicht mehr zur

Auswirkung kommen kann. Bei Viren ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens genetischer Schäden sehr hoch, da neben der DNS nur noch einige Proteine photodynamisch beeinflusst werden können. Dabei ist das Ausmaß der photodynamischen Schädigung abhängig von der Permeabilität des Virusmantels für die betreffenden Farbstoffe (GENDON 1964; RITCHIE 1965; JANOVSÁ und KLEINWÄCHTER 1968).

Auch die Untersuchungen zur Ploidiegradabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierungsrate bei verschiedenen Hefestämmen erlauben Rückschlüsse auf den Angriffsort der Hellwirkung. Daß bei der Inaktivierung von homozygoten isogenen Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades mit Farbstoff und Licht keine oder nur eine sehr geringe Ploidiegradabhängigkeit gefunden wurde (LOCHMANN et al. 1964), zeigt, daß der wirksame photodynamische Schaden bei diesen Organismen nicht an der DNS gesetzt wird.

Ähnlich wie sich die mutationsauslösende Wirkung des photodynamischen Effekts bei pro- und eukaryotischen Organismen und bei Viren unterscheidet, verhält sich auch die Reaktivierbarkeit des photodynamischen Schadens (Diskussion darüber siehe LOCHMANN und MICHELER 1972). Die fehlende Reaktivierbarkeit photodynamischer Schäden bei Hefen und z.T. auch bei Bakterien kann - wenn auch nicht zwingend - für eine photodynamische Schädigung anderer Bereiche als der DNS sprechen (vgl. auch GEISLER 1967).

Um Einblick in die Auswirkung photodynamischer Schädigung auf einzelne Stoffwechselleistungen zu erhalten, wurden z. B. die DNS-Synthese in Bakterien (EISENMAN et al. 1969) sowie die RNS- und Proteinsynthese in Hefen (LOCHMANN 1967b, LOCHMANN und PIETSCH 1967) nach Photooxidation ganzer Zellen gemessen und mit der Überlebensrate in Bezug gesetzt. Gesondert wurde auch die Atmung von *E. coli* (WALLNÖFER und BUKATSCH 1962; TERESA et al. 1965) und die anaerobe Glykolyse von Tumorzellen (HUNTER et al. 1965) getestet.

Um über den Mechanismus der photodynamischen Schädigung einer Zelle genauere Aussagen treffen zu können, ist es wichtig, die Art und das Ausmaß der photodynamischen Schädigung wichtiger Biomoleküle (Proteine, Nukleinsäuren) zu kennen.

Im allgemeinen werden ungesättigte aliphatische, aromatische und heterocyclische organische Verbindungen eher photodynamisch angegriffen als gesättigte, unsubstituierte aliphatische Komponenten.

Amino- oder Hydroxylgruppen werden bevorzugt oxidiert.

### 1.3.1 Photodynamische Behandlung von Proteinen

Einen umfassenden Überblick über die chemischen, physikalischen und biologischen Veränderungen von Proteinen nach Einwirkung von Farbstoff und Licht geben SPIKES und LIVINGSTON (1969).

Die photodynamische Zerstörung von Proteinen beruht weitgehend auf der radikalstoffsensibilisierten Peroxyoxidation von aromatischen Aminosäuren, während von den aliphatischen Aminosäuren nur die Schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin verändert werden (HILLMAN und FINKLER 1966; GUINANT und ARHELDEN 1966; GUINANT et al. 1966; TENA-SI et al. 1966; FORLUND und CALLEJO 1971). Die entstehenden Oxidationsprodukte und die Stoichiometrie der Reaktion sind unterschiedlich, es gibt mindestens zwei Reaktionstypen von Reaktionsbedingungen (Finkler, Sauer und Sauer 1966) und Sauer 1966) können es zu einer Reaktion (CHIRON und SPIKES 1966; SPIKES 1966, 1970).

Während die Seitenkettengruppen des Proteins, insbesondere die S-S-Brücken, die die Tertiärstruktur des Proteins stabilisieren, durch photodynamische Einflüsse sehr empfindlich auf Veränderungen der Proteinstruktur reagieren (HILLMAN 1967), Die Zerstörung der Seitenkettengruppen des Proteins, insbesondere der Proteine, sind die Zerstörung der Aminosäuren, die an der Aminosäurekette

ten von Enzymen, sind für die in vielen Arbeiten beschriebenen physikalischen und biologischen Veränderungen der Proteine verantwortlich, wobei besonders häufig die Verminderung der Aktivität von Enzymen gemessen (HOPKINS und SPIKES 1962, 1970; WEIL et al. 1953, 1955, 1965; DUNCAN und BOWLER 1969) wird.

### 1.2.2 Photodynamische Veränderung von Nukleinsäuren

Untersuchungen über die photodynamische Schädigung von Nukleinsäurebausteinen und von Polynukleotiden ergeben, daß bevorzugt Guanin durch viele Farbstoffe in Gegenwart von Licht oxidiert wird (SIMON und YONAKIS 1962; WACKER et al. 1963; SUSSANBACH und BERENDT 1963, 1964, 1965; LOCHMANN et al. 1964; DELLWEG und OPRÉE 1966).

Als Umwandlungsprodukte von Guaninderivaten wurden nachgewiesen  $\text{CO}_2$ , Guanidin, Ribose, Ribosylharnstoff und zum Teil Harnstoff, Pararibansäure und Peroxide (GENTRY und GORIBON 1966; WACKER et al. 1966; SUSSANBACH und BERENDT 1963, 1964, 1965; FUJITA und YAMAZAKI (1970) zeigten, daß von den Nukleinsäuren hauptsächlich der Basenanteil angegriffen wird. In einigen Arbeiten wird auch über die Photooxidation von Adenin und Adenin-Verbindungen (z. B. Coenzym A, NAD) in Gegenwart von Riboflavin berichtet (UEHARA et al. 1964, 1966a, b, c).

SIMON und YONAKIS (1962) konnten neben der bevorzugten Zerstörung von Guanin in der DNS auch eine partielle Denaturierung feststellen. FRIEDLBERG et al. (1961) zeigten, daß diese Depolymerisation durch Einzel- und vielleicht auch durch Doppelstrangbrüche verursacht wird (BELLIN und GROSSMAN 1966; BARG und BAR 1967). Photooxidierte Polynukleotide werden nicht mehr von RNase T1 gespalten (BELLIN et al. 1965; DELLWEG und OPRÉE 1966).

Die Zerstörung des Guanins in DNS, RNS und guaninhaltigen synthetischen Polynukleotiden und die daraus folgenden Konfigurationsänderungen bewirken einen starken Verlust der biologischen Aktivität dieser Verbindungen.

Die Transformationsaktivität (BELLIN und OSTER 1960; SUSSENBACH und BEHREND 1963) sowie die Template-Aktivität für die RNS-Polymerase (CHANDRA und WACKER 1966a) photodynamisch behandelter DNS ist gehemmt. Ebenso sinkt die Infektiosität von TMV-RNS nach photodynamischer Behandlung (CHESSIN 1960; TSUGITA et al. 1965; SASTRY und GORDON 1966; SINGER und FRAENKEL-CONRAT 1966; ITO et al. 1967; ORLOB 1967). Die Fähigkeit synthetischer Polyribonukleotide, als "messenger" in einem zellfreien System den AS-Einbau zu steuern, sinkt mit steigendem Guaningehalt der Polymere, wenn sie in Gegenwart von Farbstoffen mit sichtbarem Licht bestrahlt werden (SIMON et al. 1965; CHANDRA und WACKER 1966a).

Werden tRNS und rRNS bestrahlt und anschließend dem zellfreien System zugesetzt, wird die Proteinsyntheserate auch verringert (TRÄGER et al. 1964), desgleichen bei photodynamisch behandelten Ribosomen (GARVIN et al. 1969).

Die Aminosäure -Akzeptor -Aktivität photooxidierter tRNS ist beeinträchtigt (TSUGITA et al. 1965; AMAGASA und ITO 1970), wobei - zufällig - oft besonders solche Aminosäuren schlecht von der tRNS gebunden wurden, deren Codone guaninhaltig sind. Diese für die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich starken Hemmungen verführten einzelne Autoren zu der Annahme, daß die AS-tRNS-Synthetase vom Anticodon erkannt wird (KUWANO et al. 1968; CHANDRA und WACKER 1966b).

FREIFELDER und URETZ (1966) konnten zeigen, daß erst bei einer photodynamischen Behandlung, nach der weniger als 1% von T7-Phagen überlebten, in der DNS dieses Phagen Doppelstrangbrüche auftraten. Bei geringeren Dosen wurden nur Veränderungen in der DNS nachgewiesen, die nach Alkali- oder Wärmebehandlung (70°C) zu Einzel-

strangbrüchen führten.

#### 1.4 Physikochemischer Mechanismus der photodynamischen Oxidation (Effekt I)

Die meisten Untersuchungen über die physikochemischen Abläufe des photodynamischen Effekts wurden mit sehr einfachen Systemen durchgeführt, die neben Farbstoff und Lösungsmittel (meist Wasser) nur noch molekularen Sauerstoff und das zu untersuchende Substrat enthielten. Da dies nicht den komplexen Bedingungen in vivo entspricht, kann man die hierbei gewonnenen Ergebnisse nur eingeschränkt auf kompliziertere Systeme übertragen.

Alle Theorien über den physikochemischen Mechanismus des photodynamischen Effekts gehen von der Tatsache aus, daß der Farbstoff im ersten Schritt der Reaktion durch die von ihm absorbierte Energie des sichtbaren Lichtes vom Grund-(singlett)-zustand  $S_0$  in einen angeregten Singlettzustand (niedrigstes Singlettstadium =  $S_1$ ) überführt wird. Die natürliche Lebensdauer des Singlettzustandes ist sehr kurz; sie beträgt  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  sec. Durch Intersystem-Umlagerungen (Umkehrung eines Elektronenspins des  $S_1$ ) kann der Farbstoff in einen angeregten Triplettzustand gebracht werden. Für photochemische Reaktionen ist das niedrigste Triplettstadium  $T_0$  von Bedeutung, dessen natürliche Lebenszeit im Millisekundenbereich liegt (CHAMBERS und KEARN 1969; SONG und KURTIN 1969; KELLMANN 1971). Die  $S_1$ - $T_0$ -Umlagerung betrifft die  $\pi$ -Elektronen des konjugierten Systems, weshalb man sie auch mit  $\pi \rightarrow \pi^*$  Transition kennzeichnet. Obwohl im allgemeinen das Auftreten des Triplettstadiums rund  $10^{-6}$  mal weniger wahrscheinlich ist als das des angeregten Singlettzustandes, werden bei einigen Farbstoffen bis zu 50% der erzeugten angeregten Singlettzustände in Triplettzustände umgelagert. So zeichnet sich besonders TP durch eine hohe Produktion an Triplettmolekülen aus (MORI'ITA und KATO 1968).

Die Reaktivität des Triplettstadiums resultiert aus seiner langen natürlichen Lebensdauer und aus der hohen Polarität der Elektronenladungsverteilung, die mit der eines Biradikals vergleichbar ist.

Die photochemische Reaktion wird eingeleitet durch die Entaktivierung des angeregten  $T_0$ -Zustands des Farbstoffs (Sensibilisators) durch Reaktionspartner des Systems. Dabei wird unterschieden, ob der angeregte Farbstoff im nächsten Reaktionsschritt mit dem Substrat oder mit dem Sauerstoff reagiert. Im ersten Fall bilden Substrat und angeregter Farbstoff entweder einen angeregten Komplex, der dann mit Sauerstoff reagiert (KNOWLES und MAUTNER 1972) oder das Substrat wird durch den angeregten Farbstoff oxidiert, wobei der Farbstoff in die reduzierte Semichinonform überführt wird (Elektronentransfer- oder Wasserstoffabstraktions-Reaktion). Der Sauerstoff dient der Regenerierung des Farbstoffs und kann auch das Substrat noch weiter oxidieren (BAUGH et al. 1966; ZWICKER und GROSSWEINER 1963; GROSSWEINER und ZWICKER 1963; CHRYSOCHOOS und GROSSWEINER 1968; KNOWLES 1971a, b). Es ist auch nachgewiesen worden, daß bei der Reaktion zwischen Substrat und angeregtem Farbstoff Farbstoff- und Substrat-Radikale gebildet werden. Das Substrat wird dann über neue Radikalbildung mit Sauerstoff zum Endprodukt oxidiert (COLLMICK und BERG 1968; KRAMER und MAUTE 1972a, b; ZÜGEL et al. 1972).

Im zweiten Fall erfolgt entweder die Überführung des Sauerstoffs in einen angeregten reaktiven Zustand (Singlett-Oxygen), der dann mit dem Substrat reagiert (KAUTSKY et al. 1933; KAUTSKY 1937; OSTER et al. 1959; FOOTF et al. 1965; KEARNS und KHAN 1969; JORI und CAUZZO 1970), oder aber der angeregte Farbstoff bildet mit  $O_2$  einen reaktiven Farbstoff-Sauerstoff-Komplex (Sauerstoffradikal: Photoperoxid oder Moloxid), der sich dann mit dem Substrat umsetzt und es oxidiert (SCHENCK 1956; SCHENCK und KOCH 1960; SANTAMARIA 1962).

Es sei noch erwähnt, daß das Auftreten freier Radikale bei photodynamischen Reaktionen zur Intensität der biologischen Inaktivierung parallel läuft; d. h. daß freie Radikale eine wichtige Rolle beim Energieübertragungsmechanismus spielen (DELMELLE und DUCHESNE 1967; VORST 1971; VORST und Lion 1971a, b).

Nach nahezu allen diesen Theorien wird der sensibilisierende Farbstoff am Ende der Reaktion unverändert zurückerhalten, was oft nicht mit der beobachteten Wirklichkeit (in vivo) übereinstimmt.

Alle hier vorgestellten Mechanismen sind unter bestimmten experimentellen Bedingungen möglich, wobei noch nicht entschieden werden kann, welcher Mechanismus in biologischen System am häufigsten auftritt. PENZER (1970) nimmt z. B. an, daß bei der photodynamischen Reaktion mit Flavin die Purinnukleotide durch angeregten Singlett-Sauerstoff oxidiert werden, die Pyrimidinnukleotide dagegen die Wasserstoff-Abstraktions-Reaktion eingehen.

Neben den hier erwähnten physikochemischen Mechanismen der photodynamischen Erscheinung existieren weitere Vorstellungen einmal für anaerob ablaufende Reaktionen und zum anderen für Reaktionen mit Farbstoffklassen, die nicht mit denen, zu denen TP hinzugerechnet werden kann (Klasse I; GROSSWEINER 1969), verwandt sind.

Nicht entschieden ist auch die Frage, ob eine Farbstoff-Substrat-Bindung für die photodynamische Inaktivierung Voraussetzung ist. Man kann allerdings annehmen, daß für die Energieübertragung zumindest enger Kontakt notwendig ist. FIALA (1949) und SANTAMARIA (1962) nehmen an, daß der Farbstoff vor der Photonenabsorption an das Substrat der Reaktion gebunden sein muß.

Zusammenfassende Übersichten über die physikochemischen Vorgänge beim photodynamischen Effekt wurden von SPIKES (1968), FOOTE (1968) und GROSSWEINER (1969, 1970) zusammengestellt.

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Wie aus Kapitel 1 hervorgeht, wurde in sehr vielen Untersuchungen festgestellt, daß wichtige Makromoleküle der Zelle durch den photodynamischen Effekt verändert werden. Diese Veränderungen haben einen Verlust der biologischen Funktion dieser Makromoleküle und dadurch oft ein Absterben der Zelle zur Folge.

Analysen darüber, an welchen Zellkomponenten die Farbstoffe bzw. der photodynamische Effekt bevorzugt angreifen und wo in der Zelle der für die photodynamische Inaktivierung relevante Schaden gesetzt wird, sind dagegen sehr selten.

In Analogie zur Wirkung von Röntgen- und UV-Strahlen wurde auch für die photodynamische Einwirkung vermutet, daß die Zellinaktivierung durch eine Schädigung der DNS verursacht wird. Dafür sprachen vor allem die nach photodynamischer Behandlung von Nukleinsäuren gefundene bevorzugte Zerstörung von Guanin und die daraus resultierenden physikochemischen Veränderungen dieser Polymere, weiterhin die in Viren und häufig auch in Bakterien gefundene Mutagenität photodynamisch wirkender Farbstoffe in Gegenwart und in Abwesenheit sichtbaren Lichts.

Vor allem viele an eukaryotischen Versuchsobjekten erhaltene Ergebnisse über den Wirkungsmechanismus des photodynamischen Effekts ließen sich jedoch nicht ohne weiteres durch einen genetischen Schaden erklären: z.B. die Ploidiegradunabhängigkeit der Inaktivierung von HeLa-Zellen, die fehlende Mutagenität und die fehlende Reaktivierbarkeit des photodynamischen Effekts.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, zur Klärung dieser Widersprüche beizutragen. Es soll festgestellt werden, welche Zellkompo-

nenten durch photodynamische Behandlung von *Saccharomyces*-Zellen besonders angegriffen werden und wie stark sich diese Schädigung auf die Lebensfähigkeit der Zellen auswirkt. Dazu ist es notwendig, weitere molekulare Einzelheiten über den photodynamischen Effekt aufzuklären.

Für die Untersuchungen wurde Thiopyronin (TP) verwendet, da dieser Farbstoff bei Hefezellen im Vergleich zu anderen Farbstoffen den stärksten photodynamischen Effekt auslöst. Da TP in hohen Konzentrationen bereits in Abwesenheit von Licht Zellen inaktiviert, muß auch die Dunkelwirkung bei der Analyse des Hauptangriffsmechanismus der Hellwirkung berücksichtigt werden.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Saccharomyces-Stämme

Die Stämme 211-1a (haploid), 211 (diploid), 312 (triploid), 415 und 2200 (tetraploid) und 600 (hexaploid) sind - mit Ausnahme des Paarungstypalleles - weitgehend isogen und homozygot. Ihre Eigenschaften und Kultivierungsbedingungen sind früher beschrieben worden (LASKOWSKI 1962; REICHERT 1969).

##### 3.1.2 Thiopyronin (TP)

Thiopyronin, im folgenden mit TP abgekürzt, wurde von der Fa. Merck (Darmstadt) als  $\text{ZnCl}_2$ -Doppelsalz bezogen. Radioaktives TP wurde von NEN Chemicals (Dreieichenhain) tritiert. Die spezifische Radioaktivität der Stammlösung beträgt 3,2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Vor Gebrauch wurde  $\text{TP-H}^3$  über eine DEAE-Cellulose-Säule gereinigt. Nicht radioaktives TP brauchte nicht weiter gereinigt zu werden.

Kurze Charakterisierung (Abb. 3): TP, ein Thioxanthenfarbstoff, Molekulargewicht 455, liegt in neutralen wäßrigen Lösungen, als Kation vor. TP hat im sichtbaren Bereich des Spektrums ein Absorptionsmaximum bei 564 m $\mu$ , im kurzwelligen Bereich bei 280 m $\mu$ . Mit steigender TP-Konzentration bilden sich zunehmend TP-Dimere oder höhere TP-Aggregate, was man in dem Auftreten und der Zunahme eines zweiten peaks im sichtbaren Bereich bei 535 m $\mu$  verfolgen kann. Das Beer'sche Gesetz ist bis zu Konzentrationen von etwa 23  $\mu$ M erfüllt.

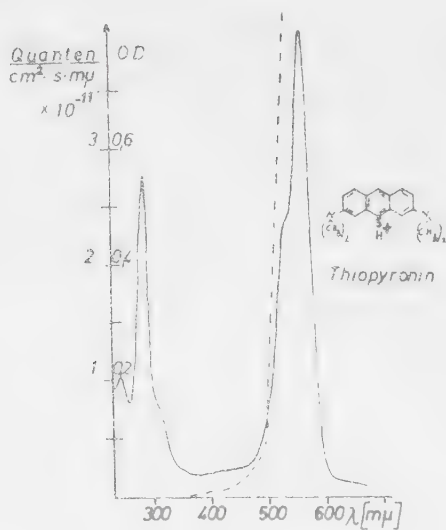


Abb. 3

Absorptionsspektrum und Strukturformel von TP in neutraler Lösung.

----- Teil des Spektrums der verwendeten Glühlampe (200 W). Es soll gezeigt werden, daß das Spektrum der Lampe keinen UV-Anteil besitzt.

(Die angegebene quantitative Beziehung gilt für Bestrahlungen im Abstand von 20 cm. Der Quantenfluß erniedrigt sich um den Faktor 0,4, wenn im Abstand von 30 cm bestrahlt wird).

Für nahezu alle Bindungsversuche wurden TP-Konzentrationen  $< 23 \mu$ M verwendet.

Das Spektrum ist nicht beeinflussbar durch die bei den Bindungsversuchen verwendeten Na<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen; ist jedoch

sehr von der  $H^+$ -Ionenkonzentration abhängig.

### 3.1.3 Sonstige Substanzen und Zusammensetzungen von Lösungen

DNS: hochpolymere reine Kalbsthymus DNS (Fa. Serva) und  
hochpolymere reine Lachssperma DNS (Fa. Serva)

tRNS: unspezifische Hefe tRNS (Fa. Sigma)

synthetische Polynukleotide: Kaliumsalze von PolyA, PolyC, PolyAG,  
(Fa. Sigma) und PolyU (Fa. Serva)

Albumin aus Rinderserum (Fa. Serva)

radioaktive Substanzen: Uracil-2- $C^{14}$ , Adenin-8- $C^{14}$ , Leucin-1- $C^{14}$   
Phenylalanin-U- $C^{14}$  (Fa. NEN Chemicals)

Puffer: 0.05 M  $KH_2PO_4$ , pH 7.5; im folgenden nur Puffer genannt.

0.05 M Natrium-Citratpuffer mit 0.1 M Glucose; pH 5,5

TMA-Puffer: 30 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-acetat,

22 mM  $NH_4Cl$ , 1 mM 2-Mercaptoäthanol; pH 7,5; für die

Versuche zur Proteinbiosynthese in vitro wurde die Mg-acetat-Konzentration auf 15 mM erhöht.

Nährmedien: Vollmedium (VM): 1% Difco Yeast Extract, 0.5 % Pepton  
2 % Glucose, für Platten zusätzlich 2% Agar.

GYNP: 1 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 0.5 %  
Pepton, 2 % Glucose.

Szintillationsflüssigkeit: Mischung 1:8 g/lit Omnifluor in Dioxan  
Mischung 2:4 g/lit Omnifluor in Toluol.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Verwendete Geräte

Spektralphotometer der Fa. Beckman, Modell DB-GT mit angeschloss-  
nem Linear-Zehn-Zoll-Potentiometer Schreiber,

Kolorimeter nach Dr. B. Lange (MJ) mit Rotfilter,  
 Spino-Ultrazentrifuge, Fa. Beckman, L 50,  
 Homogenisator Kobold der Fa. Braun, Melsungen,  
 Szintillationszähler der Fa. Tracerlab.

### 3.2.2 Strahlenquellen

Sichtbares Licht: Wolframlampe, Osram, 200 Watt  
 Spektrum der Lampe siehe Abb. 3,

Röntgenstrahlen: Machlett-Röntgenröhre der Firma Seifert, OEG-60,  
 W-Anode, Be-Fenster. Dosisleistung: 10 krad/min; 55 kV, 20 mA.

### 3.2.3 Durchführung der Versuche

Inaktivierungsversuche. Die Kultur, die durch Überimpfen der *Saccharomyces*-Zellen vom Schrägagar in VM entstand, wurde 48 Stunden bei 30°C bebrütet, so daß fast ausschließlich stationäre Zellen geerntet wurden.

Die Zellen wurden vom VM abzentrifugiert und 3 mal mit Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Einzelzellen durch fraktionierte Zentrifugation von Doppelzellen und Zellklumpen getrennt und der Zell-titer so eingestellt, daß nach Zugabe der TP-Lösung die Suspension  $5 \times 10^5$  Zellen/ml enthielt. Die Zellsuspension wurde mit TP der gewünschten Konzentration unterschiedlich lange inkubiert. Endkonzentration, Inkubationszeit und Temperatur wurden je nach Fragestellung des Versuchs variiert. Entweder sofort oder nach Abzentrifugieren und Resuspendieren in Puffer wurden die "Hell"-Proben in kleinen Petrischalen unter Rühren mit sichtbarem Licht (3 mm Schichtdicke) bestrahlt. Die Variation der Dosis, des Bestrahlungsmilieus und der Temperatur ist bei den einzelnen Versuchen gesondert aufgeführt. Während der Dunkelinkubation oder während der Bestrahlung wurden nach bestimmten Zeitabständen 0,1 ml-Proben entnommen, mit 9,9 ml

Puffer verdünnt und je 0,1 ml der gut gemischten Suspension auf Vollmedium-Platten ausgespatelt.

Nur im Versuch zum Einfluß der TP-Konzentration auf die Überlebensrate wurden die einzelnen Proben so verdünnt, daß - unter Abschätzung der Inaktivierungsrate - nicht weniger als 200 Zellen pro Platte zu erwarten waren.

Nach 3tägiger Bebrütung bei 30°C wurden die gebildeten makroskopischen Kolonien gezählt.

Aufnahmeversuche. Die Durchführung der Aufnahmeversuche ist bereits beschrieben worden (MICHELER und LOCHMANN 1971).

Verteilung von TP in vivo. Diploide Saccharomyceszellen (211) aus der stationären Wachstumsphase (48 Stdn. in VM bei 30°C kultiviert) wurden in TP-H<sup>3</sup>-Lösung (Endkonzentration siehe Tabelle 1, 0.032 µCi/µg) 30 bzw. 60 min gerührt, anschließend 6 mal mit Puffer gewaschen, 1 Std. in Puffer suspendiert und anschließend nochmals gewaschen.

Dann wurden die angefärbten Zellen im TMA-Puffer mit Glaskugeln (Ø 5 mm) 3 min homogenisiert (bei Versuch 3 unter Zusatz von 1% Na-dodecylsulfat = SDS); die Zellen waren zu mehr als 99,99% zerstört.

Nur in Versuch 5 wurde dann das Homogenisat 1 Std. mit 1% Na-dodecylsulfat auf 40-50°C erwärmt.

Dann wurde das Homogenisat 30 min bei 15.000 Upm (12.000 g) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit TMA-Puffer gewaschen und nochmals in gleicher Weise zentrifugiert. Der Niederschlag, der im wesentlichen aus Zellwand- und Membranbruchstücken und aus Mitochondrien besteht, wurde in destilliertem Wasser aufgenommen. Aus dem Überstand der ersten Zentrifugation wurden die Ribosomen durch 90 minütige Zentrifugation bei 50.000 Upm (105.000 g) niedergeschlagen, noch einmal gewaschen und zentrifugiert. dann in

destilliertem Wasser aufgenommen (Ribosomenfraktion). Der Überstand der ersten Ribosomenzentrifugation, der DNS, tRNA, Überstandsproteine und niedermolekulare Bestandteile enthält, wurde entweder in dieser Form zur weiteren Messung verwendet (Überstandsfraktion) oder die hochmolekularen Anteile durch TCA- oder Äthanol-fällung abgetrennt oder über Sephadex G 25 chromatographiert. Von definierten Suspensionsmengen aller Fraktionen wurde die Radioaktivität (0,1-; 0,2-; 0,4- ml Probe + 10 ml Szintillationsmischung 1) und die Zellmasse durch Auswägung nach Gefriertrocknung bestimmt. Daraus wurde die prozentuale Verteilung der Gesamtradioaktivität auf die Zellfraktionen und die spezifische Radioaktivität der einzelnen Fraktionen (im Versuch 2, 3a und 3b) berechnet.

Bindungsversuche. Prinzip der spektralphotometrischen Untersuchung. Zu TP-Lösung konstanter Konzentration wurden unterschiedliche Mengen Polymer hinzugegeben. Die Lösungen wurden gut gemischt und etwa eine halbe Std. stehengelassen. Dann wurden die Spektren der Proben im Spektralphotometer mit automatischem Schreiber aufgenommen und mit dem Spektrum des gleichkonzentrierten freien TP verglichen.

Die molaren Konzentrationen der Polymere wurden unter Berücksichtigung des mittleren Molekulargewichts der Nukleotidmonophosphate ermittelt. Die gewünschte Ionenstärke wurde, wenn nicht anders angegeben, durch NaCl eingestellt. Der Einfluß zweiwertiger Ionen wurde durch Zugabe entsprechender Mengen  $MgCl_2$  geprüft.

Dialyse. 20 ml TP wurden in gut verschraubbare 50 ml-Fläschchen gefüllt. 0,5 ml DNS (als Kontrolle: 0,5 ml TP oder  $H_2O$ ) wurden in 4,5 cm lange und 1 cm breite, zuvor in destilliertem Wasser gekochte Dialysesäckchen (Porengröße 3  $m\mu$ ) gefüllt, die anschließend mit Zwirn zugeknötet und in die TP-Lösung eingetaucht wurden. Zur guten Durchmischung wurden die Proben gerührt, entweder bei  $10^\circ C$  oder bei  $0^\circ C$ .

Nach Einstellung des Dialysegleichgewichts (ca. 60 Stdn.) wurde die Dialyse beendet.

In den einzelnen Versuchen wurde entweder die DNS oder die TP-Konzentration variiert. Im Falle der Variation der TP-Konzentration mußte für jede TP-Konzentration die Menge des an Glas und Dialysemembran adsorbierten TP's ermittelt werden, um die Meßwerte entsprechend korrigieren zu können.

Das Ausmaß der TP-Bindung an DNS wurde durch die Abnahme der TP-Konzentration in der Außenlösung gemessen.

Hitzenaturierung. Lachssperma DNS wurde in 0,14 M NaCl-Lösung gelöst. Kurz vor den Versuchen wurde eine Konzentration von 614  $\mu$  Mol Nukleotid/lit eingestellt.

Die DNS-Proben wurden 1:2 mit TP-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen vermischt, in Küvetten gefüllt und mindestens eine halbe Stunde stehengelassen. Die Ionenstärke betrug 0,007.

In einem Wasserbad wurden die Proben schrittweise erhitzt und die optische Dichte bei 260 m $\mu$  bei den gewünschten Temperaturen gemessen. Mit einem Temperaturfühler konnten jeweils die Temperaturen der Lösung innerhalb der Küvetten gemessen werden. Der Küvettenraum des Spektralphotometers wurde ebenfalls auf die jeweiligen Meßtemperaturen erhitzt, so daß ein Abkühlen der Proben während der Messung verhindert werden konnte.

Als Vergleichslösung wurde die optische Dichte einer Uracil-Lösung bei allen Temperaturen gemessen, um Fehler, die durch Wasserausdehnung und -verdunstung entstehen, korrigieren zu können.

Die Schmelzpunkte ( $T_m$ -Werte) wurden graphisch ermittelt nach MAR-MUR und DOTY (1962).

Um die einzelnen Schmelzkurven besser vergleichen zu können, wurde die optische Dichte<sub>260</sub> der zugegebenen TP-Lösung von der optischen Dichte<sub>260</sub> der DNS-TP-Lösung subtrahiert.

Proteinbiosynthese in vitro. Aufbau, Eigenschaften und Funktion des zellfreien Protein synthetisierenden Systems sind ausführlich beschrieben worden (UTTECH 1972; UTTECH und LOCHMANN 1972).

Jeder Ansatz zur zellfreien Proteinsynthese enthält folgende Substanzmengen pro Ansatz (0,6 ml):

in mg: Ribosomen ca. 4; Enzyme (Überstandsfraktion) 1-1,5; PolyU 0,05; tRNS-Gemisch 0,125; Pyruvat-Kinase 0,01.

in  $\mu$  Mol: ATP 1,18; GTP 1,15; PEP 4,85; Mg-Acetat 13; Tris-Acetat (pH 7,5) 18; Mercaptoäthanol 0,6;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  13,2, Phenylalanin- $\text{u-C}^{14}$  (48,5 mCi/mMol) 0,01.

Durchführung der Versuche. Entweder zum Gesamtsystem oder zu einzelnen Komponenten wurden entsprechend konzentrierte TP-Lösungen hinzugegeben, deren Volumen nicht mehr als maximal 10% des Volumens der Probe betrugen. Die Kontrollen wurden entsprechend mit TMA-Puffer versetzt. Für die photodynamischen Untersuchungen wurden die Proben nach x min Inkubationszeit mit sichtbarem Licht (200 W, 20 oder 30 cm Abstand) bestrahlt. Inkubation und Bestrahlung wurde bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Phe- $\text{C}^{14}$  inkubiert und 60 min bei  $30^\circ\text{C}$  bebrütet. Dann wurde die Reaktion gestoppt, die Proben für die Messung der Radioaktivität aufbereitet (Szintillationsmischung 1) und diese im Szintillationszähler gemessen. Zur Kontrolle der Güte des Systems wurde jedes System nach Neuisolierung der Komponenten auf seine Abhängigkeit von den einzelnen Komponenten hin geprüft.

Purinaufnahme. Stationäre Zellen (2200, 24 Std. in GYNP bei  $30^\circ\text{C}$  kultiviert) wurden vom Medium abzentrifugiert und 3 mal in Citratpuffer gewaschen, dann 2 Std. in Citratpuffer, der 2 % Glucose enthielt, gerührt.

Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension mit Citrat-Puffer (Kontrolle), der andere Teil mit TP (Endkonzentration 2,5; 18; 33

(70  $\mu$  M) versetzt und 5 min im Dunkeln gerührt (Titer:  $4 \times 10^7$  Zellen/ml).

Jeweils die Hälfte der Suspension wurde anschließend 10 min mit sichtbarem Licht (200 W, 30 cm) bestrahlt.

Sofort nach der Dunkel- bzw. Hellbehandlung wurden die Hefesuspensionen 1:2 mit radioaktiver Purinlösung versetzt. (Endkonzentration: 0,12 mM Adenin-8- $^{14}$ C (28,9 mCi/mMol),  $2 \times 10^7$  Zellen/ml Ansatz).

Nach den gewählten Aufnahmezeiten wurden 0,5 ml-Proben entnommen, die Zellen vom radioaktiven Überstand abfiltriert (Glasfaser-Filter) und mit 10 ml Citratpuffer (+2% Glucose) nachgespült; die getrockneten Filter mit Szintillationsmischung 2 versetzt und die Radioaktivität ermittelt. Die gemessene Radioaktivität ist ein Maß für die Aufnahme der im Inkubationsmedium angebotenen Purine.

Uracil- und Aminosäure-Aufnahme. Stationäre tetraploide Zellen des Stammes 2200 (48 Stdn. in VM bei 30°C kultiviert) wurden vom VM abzentrifugiert und 3 ml in Puffer gewaschen.

Für die photodynamischen Untersuchungen wurde die Zellsuspension mit TP (Endkonzentration: 22 bzw. 44  $\mu$  M), die Kontrolle mit Puffer versetzt und 10 min im Dunkeln gerührt, abzentrifugiert, 4 mal gewaschen und in Puffer resuspendiert. Von den TP-inkubierten Suspensionen wird ein Teil als 0-min Wert entnommen, der Rest mit sichtbarem Licht bestrahlt (200 W, 20 cm) und nach bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen.

Für die Röntgenbestrahlungsversuche wurden die gewaschenen Zellsuspensionen in großen Petrischalen mit 10 krad/min 2, 4, 8 und 12 min bestrahlt.

Alle Proben wurde anschließend in frisches warmes VM gegeben und in Nasenkolben bei 30°C geschüttelt. Die Anfangsextinktion, die mit Rotfilter gemessen wurde, da die Proben teilweise noch angefärbt waren, betrug etwa 0,100.

Sofort und in Stundenabständen wurde die optische Dichte gemessen und 2 ml-Proben entnommen, die mit 0,1 ml einer Uracil-2- $^{14}\text{C}$  ( $1\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ;  $7\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ), einer Phe-u- oder einer Leu-1- $^{14}\text{C}$ -Lösung ( $5\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ;  $5/\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ) inkubiert und 15 min bei  $30^\circ\text{C}$  bebrütet wurden.

Nach 15 min wurde je 1 ml auf Glasfaserfilter gegeben, abgenutscht, mit 10 ml destilliertem Wasser nachgespült, die Filter getrocknet und in Polyäthylenfläschchen mit 5 ml Szintillationsmischung 2 versetzt.

Die Adsorption der radioaktiven Substanzen an die Filter war vernachlässigbar gering, so daß die Messung nicht beeinflusst wurde.

Aus der optischen Dichte wurde die Zellzahl/ml anhand einer Eichkurve ermittelt. Die gemessenen Ipm wurden auf die Zellzahl der jeweiligen Probe bezogen.

#### 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

##### 4.1 Inaktivierungsversuche mit Saccharomyceszellen

Vergleichende Inaktivierungsversuche mit Saccharomyceszellen mit verschiedenen Farbstoffen in Gegenwart von sichtbarem Licht zeigten, daß TP photodynamisch besonders wirksam ist (LOCHMANN et al. 1965a, LOCHMANN 1966). Schon kurzzeitige (10 min) Inkubation von Hefezellen in einer TP-Lösung geringer Konzentration (z. B.  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$   $22\text{ }\mu\text{M}$ ) sensibilisiert diese stark gegen sichtbares Licht. Bei gleicher Behandlung im Dunkeln kann nur ein sehr geringer Einfluß festgestellt werden (vgl. auch LOCHMANN et al. 1964). MORITA und KATO (1968) konnten anhand von Blitz-Photolysis-Experimenten zeigen, daß die hohe photodynamische Effektivität von TP auf die hohe Quantenausbeute der Triplett-Erzeugung und auf seine starke Redox-reversibilität zurückzuführen ist (vgl. Kap. 1).

Das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung zellulärer Systeme bei konstanter Bestrahlungszeit ist von vielen Bedingungen abhängig. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muß deshalb der Einfluß z. B. der Farbstoffkonzentration in der Zelle, der Inkubations- oder Bestrahlungstemperatur, des Bestrahlungsmilieus, der Bestrahlungs-Nachbehandlung, der Kulturbedingungen und des Alters der verwendeten Organismen, sowie spezieller genetisch bedingter Eigenschaften der Organismen auf die photodynamische Inaktivierungsrate beachtet werden. Da die Variation derartiger Parameter oft auch erste Einblicke in den Mechanismus der photodynamischen Inaktivierung ermöglicht, soll der Einfluß einiger dieser Inaktivierungsbedingungen bei der photodynamischen Behandlung von *Saccharomyces*-Zellen gezeigt werden.

#### 4.1.1 Einfluß der TP-Konzentration

Die TP-Konzentration innerhalb von Zellen kann durch unterschiedlich lange Inkubation der Zellen in einer TP-Lösung konstanter Konzentration oder durch ihre Inkubation in TP-Lösungen verschiedener Konzentrationen unterschiedlich hohe Werte erreichen (vgl. Kap. 4.2).

##### 4.1.1.1 Variation der Vorinkubationszeit

Diploide *Saccharomyces*-Zellen (Stamm 211) wurden vor der Bestrahlung unterschiedliche Zeitintervalle in einer TP-Lösung ( $c = 22 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ) im Dunkeln inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend in TP-Lösung bestrahlt; ein anderer Teil wurde von der TP-Lösung abzentrifugiert und in Puffer suspendiert und bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 500 W-Lampe im Abstand vom 30 cm.

Abb. 4a und b zeigen, daß mit zunehmender Vorinkubationszeit der Zellen die Überlebensrate zuerst stark abnimmt. Bei längeren Vorinkubationszeiten wird die Inaktivierungsrate zwar weiterhin erhöht, jedoch in einem mit abnehmender Bestrahlungszeit immer geringerem Ausmaß. Die Bestrahlung in Puffer führt zu höheren Inaktivierungsrat

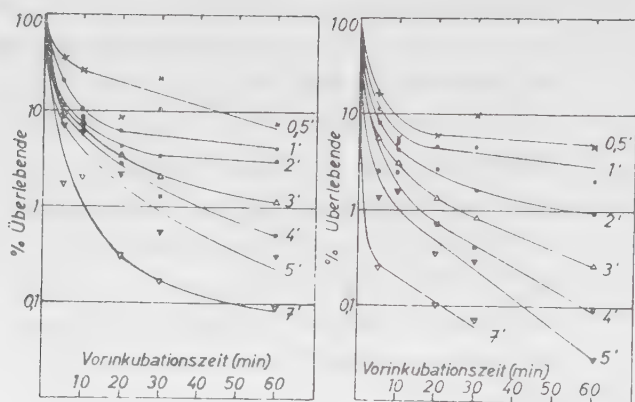


Abb. 4 Einfluß der Vorinkubationszeit auf die Überlebensrate photodynamisch behandelter *Saccharomyces*zellen.

a. Bestrahlung in TP-Lösung

b. Bestrahlung in Puffer

Die Bestrahlungszeit ist jeweils neben den Inaktivierungskurven angegeben.

als die Bestrahlung in TP-Lösung. Das ist erklärlich, da bei der Bestrahlung in Puffer ein größerer Teil des eingestrahlt Lichts photodynamisch genutzt werden kann als bei Bestrahlung in TP-Lösung. Die Lichtenergie wird in diesem Fall nicht zusätzlich durch den Farbstoff in der Inkubationslösung absorbiert.

Vergleicht man diese Inaktivierungskurven mit der TP-Aufnahme in die Zelle (die später noch eingehend in Kap. 4.2 behandelt wird) (Abb. 7), fällt auf, daß in beiden Fällen nach ungefähr 10-15 min eine mehr oder minder stark ausgeprägte Sättigungsphase eintritt. Diese Parallelität deutet darauf hin, daß das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung bei konstanter Bestrahlungszeit von der Menge des in der

Zelle vorhandenen Farbstoffs abhängt. Aber auch die Dauer der Einwirkzeit nach der Aufnahmesättigung ist für das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung wichtig. Das wird bei hohen Bestrahlungsdosen besonders deutlich (Abb. 4b). Das ist eventuell darauf zurückzuführen, daß sich erst nach längerer Zeit ein Gleichgewicht der TP-Bindung zwischen verschiedenen Zellkomponenten einstellt, d.h. daß an diese im Verlauf der Inkubationszeit unterschiedlich viel TP gebunden ist, was zu unterschiedlich starker biologischer Inaktivierung der Gesamtzelle führen kann.

#### 4.1.1.2 Variation der TP-Konzentration

Stationäre Zellen des Stammes 211 wurden 5 bzw. 60 min in TP-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert, anschließend abzentrifugiert, in Puffer resuspendiert und bestrahlt (200 W, 30 cm).

Die Abb. 5a und b stellen die Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der TP-Konzentration der Inkubationslösung bei 3 Bestrahlungszeiten dar. Um das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung zu ermitteln, wurden alle Werte auf die Dunkelinaktivierungsrate bezogen,

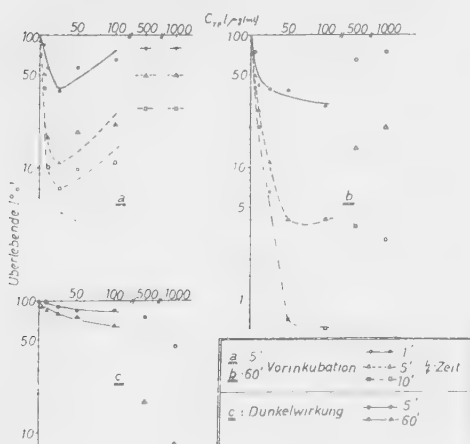


Abb. 5  
Hell- und Dunkelinaktivierung von Saccharomyceszellen durch TP bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen.

die gleich 100 % gesetzt wurde. Abb. 5a zeigt die Dunkelwirkung in Abhängigkeit von der TP-Konzentration nach 5 min und nach 60 min Inkubation.

Die photodynamische Inaktivierungsrate der 5 und 60 minütig vorinkubierten Zellen nimmt mit steigender Konzentration der Vorinkubationslösung bis zu  $25 \mu\text{g/ml}$  bzw. bis zu ungefähr  $50 \mu\text{g/ml}$  zu (Abb. 5a und b). Weitere Konzentrationserhöhung der Inkubationslösung steigert die Inaktivierungsrate nicht weiter, sondern schwächt sie im Bereich hoher Konzentrationen sogar wieder ab.

5 oder 60 Minuten Dunkeleinwirkung von TP-Lösungen der Konzentrationen zwischen 1 und  $100 \mu\text{g/ml}$  inaktivieren die *Saccharomyces*-zellen relativ wenig (Abb. 5c). Erst hohe TP-Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ ) mindern die Überlebensrate erheblich, wobei sich auch die unterschiedliche Inkubationszeit stärker auswirkt.

Zur Deutung des Verlaufs der Inaktivierungskurven ist es notwendig, das Ausmaß der TP-Aufnahme bei den verwendeten Konzentrationen nach 5 min und nach 60 min zu kennen.

Aus Abb. 7, die die Abhängigkeit der TP-Aufnahme von der Inkubationszeit bei verschiedenen TP-Konzentrationen zeigt, ist ersichtlich, daß die TP-Aufnahme nach 5 min noch nicht gesättigt ist, wohl aber nach 60 min. Das bedeutet, daß - bei gleicher Außenkonzentration - nach 60 min mehr TP von der Zelle aufgenommen worden ist als nach 5 min. Außerdem ist nach 5 min Inkubation der größte Teil des aufgenommenen Farbstoffs an Zellwänden und Membranen und bei hohen Konzentrationen auch zu einem geringen Teil innerhalb der Zelle gebunden. Nach 60 min Inkubation nimmt die Zelle keinen weiteren Farbstoff auf, d.h. sie steht mit ihrer Umgebung im Gleichgewicht. Der Farbstoff ist sowohl innerhalb der Zelle als auch an und in der Zellmembran und Zellwand gebunden (vgl. Kap. 4.3). Je höher die Außenkonzentration desto höher ist auch die Innenkonzentration an freiem TP (vgl. Kap. 4.2).

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Menge und Verteilung von TP in der Zelle ergibt sich zusammengefaßt folgende Interpretation der Ergebnisse:

Die Zunahme der photodynamischen Inaktivierungsrate ist - wie schon in Kap. 4. 1. 1. 1 gezeigt wurde - auf ein Ansteigen der TP-Innenkonzentration zurückzuführen. Die Menge der vom Farbstoff auf das Substrat übertragenen Energie wächst mit der Anzahl der TP-Moleküle in der Zelle. Die Abnahme der photodynamischen Wirkung nach Überschreiten "optimaler" Konzentrationen ist wohl hauptsächlich auf Konzentrationslöschung der Quantenausbeute der photochemischen Primärreaktionen (Tripletterzeugung) zurückzuführen (Dimerenbildung, Eigenlöschung) (z. B. MEIER 1963; FÖRSTER 1951). Außerdem wird an dem freien TP innerhalb der Zelle ein Teil der eingestrahlten Energie absorbiert und so die mit TP-gebundenen Zellkomponenten teilweise vor der Bestrahlung geschützt.

Einen qualitativ gleichen Verlauf der Inaktivierungskurven erhielt LOCHMANN (1967a). Hier wurden die Zellen allerdings in TP-Lösung bestrahlt, so daß die Abnahme der Inaktivierung bei höheren TP-Konzentrationen hauptsächlich auf die Schutzwirkung des Farbstoffs in der Außenlösung zurückzuführen ist (vgl. Kap. 4. 1. 1. 1). Da die Inaktivierungsrate nach 60 min Vorinkubation in TP-Konzentrationen, bei denen nach 5minütiger Vorinkubation die Inaktivierung nicht mehr ansteigt, weiterhin gesteigert wird, kann es als wahrscheinlich angesehen werden, daß neben der absoluten Menge des Farbstoff pro Zelle auch seine Lokalisation innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle für das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung spielt.

Es ist z. B. vorstellbar, daß bei dichter peripherer TP-Besetzung einer Zelle die Konzentrationslöschung stärker auftritt als bei Gleichverteilung derselben TP-Menge über alle Zellkomponenten. Außerdem ist die Verteilung der photodynamischen "Treffer" auf die einzelnen Zellkomponenten in beiden oben genannten Fällen unterschiedlich.

Wie schon früher mitgeteilt wurde (u. a. LOCHMANN 1967a), ist die Dunkelwirkung von TP erst bei hohen Farbstoffkonzentrationen deutlich feststellbar. Ob die quantitativ unterschiedliche Inaktivierung nach 6 bzw. 60 min Vorinkubation nur auf die unterschiedliche Farbstoffmenge pro Zelle oder zusätzlich auch auf die unterschiedliche Lokalisation des Farbstoffs innerhalb der Zelle zurückzuführen ist, kann durch diesen Versuch nicht endgültig entschieden werden.

#### 4. 1. 2 Einfluß der Inkubations- und Bestrahlungstemperatur

Ein wichtiger Parameter bei photodynamischen Untersuchungen kann die Inkubations- und die Bestrahlungstemperatur sein. Wenn die Temperatur das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung beeinflusst, muß auf Einstellung und Konstanthaltung der Temperatur während des Versuchs geachtet werden, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Dies gilt besonders für längere Bestrahlungszeiten, bei denen sich die Proben im Verlauf eines Versuchs stark erwärmen können. Außerdem wird bei einigen Untersuchungen bei Temperaturen gearbeitet, die stark von der Zimmertemperatur abweichen (z. B.  $0^{\circ}\text{C}$ ). Hier ist die Kenntnis der Temperaturabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung für den Vergleich dieser Ergebnisse mit solchen, die bei anderen Temperaturen gewonnen wurden, Voraussetzung. Schließlich kann die Abhängigkeit des photodynamischen Effekts von der Temperatur zur Klärung des Mechanismus dieses Effekts beitragen.

Aus diesen Gründen wurde der Einfluß der Temperatur während der Vorbehandlungs- und Bestrahlungszeit auf die Koloniebildungsfähigkeit photodynamisch behandelter Hefezellen getestet.

Entweder nur die Vorinkubation oder nur die Bestrahlung oder beide Vorgänge wurden bei Temperaturen zwischen  $0^{\circ}$  und  $40^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Wenn die Temperatur nicht gesondert angegeben wird, wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet.

Diploide *Saccharomyces*zellen (211) wurden 5 min in TP Lösung ( $c = 22 \mu M$ ) inkubiert, dann abzentrifugiert, in Puffer resuspendiert und mit einer 200 W-Lampe im Abstand von 30 cm bestrahlt.

In Abb. 6a erkennt man, daß mit zunehmender Inkubationstemperatur die Überlebensrate der Zellen - besonders nach längerer Bestrahlungszeit - absinkt. Betrachtet man die TP-Aufnahmegeschwindigkeit bei den verschiedenen Temperaturen (Abb. 9), zeigt sich, daß diese r

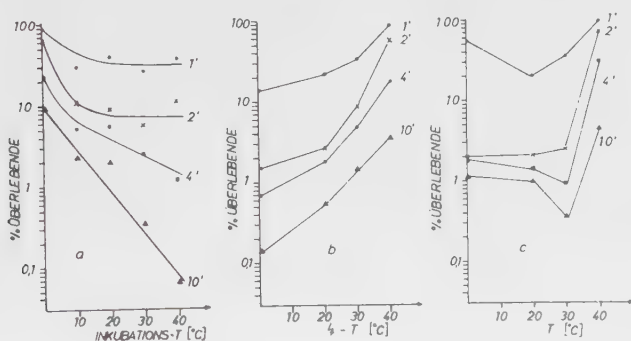


Abb. 6 Beeinflussung der photodynamischen Inaktivierung durch Variation der Inkubationstemperatur (a), der Bestrahlungstemperatur (b) oder der Inkubations- und Bestrahlungstemperatur (c). Die Bestrahlungszeit ist jeweils neben den Inaktivierungskurven aufgeführt.

ansteigender Temperatur stark zunimmt. Da für die Inaktivierungsversuche eine Vorinkubationszeit gewählt wurde, bei der die Aufnahme noch nicht gesättigt ist, bedeutet die Zunahme der Aufnahmegeschwindigkeit mit ansteigender Temperatur eine entsprechende Erhöhung der TP-Innenkonzentration.

Die bei längerer Bestrahlungszeit zu beobachtende Inaktivierungszunahme ist also sicherlich auf die mit ansteigender Temperatur ebenfalls zunehmende TP-Konzentration pro Zelle zurückzuführen. Bei kurzer Bestrahlungszeit scheint die durch die zunehmende TP-Menge pro Zelle bewirkte, langsam ansteigende Löschung der Energieübertragung die Anzahl der "Treffer" so gering zu halten, daß ab einer bestimmten Innenkonzentration die Inaktivierung der Zellen nicht weiter zunimmt, was nicht ausschließt, daß sich z.B. die Wachstumsgeschwindigkeit verlangsamt.

Erst bei Überschreiten eines Schwellenwertes an Treffern, die die Zelle nicht mehr "kompensieren" kann, (bei 4 und 10 min Bestrahlungszeit in Abb. 6a) wird sie in ihrer Fähigkeit, makroskopisch sichtbare Kolonien zu bilden, wesentlich beeinträchtigt.

Diese Erklärung, daß die Summation der Treffer auch ausschlaggebend für das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung ist, ist sehr hypothetisch; allerdings deutet sich auch in Abb. 5b (besonders nach 1 min Bestrahlung) ein ähnliches Verhalten an.

Der Einfluß der Temperatur während der Bestrahlung zeigt Abb. 6b. Die TP-Konzentration in den Zellen ist nicht unterschiedlich, da die Vorinkubationstemperatur konstant 22°C betrug. Der inaktivierende Einfluß der Bestrahlung läßt mit Erhöhung der Temperatur von 0° auf 40°C während der Bestrahlung stark nach.

Dieses Verhalten ist durch mindestens zwei sich überlagernde Effekte erklärbar:

Analog der Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit mit steigender Temperatur steigt auch die Auswärtsdiffusion des Farbstoffs. Das hat zur Folge, daß bei hohen Temperaturen die TP-Konzentration in der Zelle gegenüber der bei tiefen Temperaturen sehr verringert ist.

Zum zweiten ist anzunehmen, daß mit steigender Temperatur die Quantenausbeute der photodynamischen Reaktion von TP mit dem Substrat abnimmt. Mit steigender Temperatur geht ein zunehmender

Teil der eigentlich verwertbaren Übertragungsenergie verloren, da er bereits durch innermolekulare Zusammenstöße der Teilchen abgeführt wird, u. a. als Schwingungsenergie und Wärme<sup>\* \*</sup>.

Die aus beiden Vorgängen resultierende Abnahme der Rate der Energieübertragung vom Farbstoff auf das Substrat führt dazu, daß bei hohen Temperaturen weniger Zellstrukturen inaktiviert werden.

Die Überlagerung beider oben beschriebener Temperatureffekte zeigt Abb. 6c. Steigende Inkubationstemperaturen bewirken stetige Zunahme der Inaktivierungsrate. Steigende Bestrahlungstemperaturen erhöhen die Überlebensrate.

#### 4.1.3 Einfluß der Zuchtbedingungen und des Alters der Vorkultur

Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Bedingungen der Hefeaufzucht konstant gehalten. Die Inaktivierungsrate nach photodynamischer Behandlung veränderte sich nicht wesentlich in Abhängigkeit vom Alter stationärer Zellen (geprüft im Bereich von 12-72 Stunden).

Der Einfluß der Wachstumsphasen während des logarithmischen Wachstums wurde noch nicht geprüft, da er methodisch wegen der hohen Knospenzahl und der Klumpenbildung schwer zu untersuchen ist. Da, wie in Kap. 4.2.4 gezeigt (Abb. 12), sich die Aufnahmegeschwindigkeit von TP während der logarithmischen Phase stark verändert, ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen bei gleicher (kurzer) Inkubations- und Bestrahlungszeit zumindest wegen der unterschiedlichen TP-Konzentration in der Zelle zu erwarten.

---

<sup>\* \*</sup> Diese einfache Beziehung kann wahrscheinlich nur für TP-Konzentrationen gelten, bei denen sich kaum Dimere bilden. - Da Dimere den Monomeren einen Teil der Anregungsenergie entziehen, würde eine Temperaturerhöhung, die das Gleichgewicht Dimer-Monomer zugunsten der Monomere verschiebt, zu einer Erhöhung der Quantenausbeute der photodynamischen Reaktion führen.

## 4.2 Aufnahme von TP in Saccharomyceszellen

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, daß das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung bzw. die Ausbeute der Energieübertragung zwischen Farbstoff und Substrat besonders von der Bestrahlungszeit, von der TP-Konzentration und -Verteilung in der Zelle und von der Bestrahlungstemperatur abhängig ist.

Über den Wirkungsort von TP in der Zelle können jedoch anhand der Inaktivierungsversuche nur Vermutungen angestellt, aber keine genaueren Aussagen gemacht werden. Voraussetzung für die TP-Wirkung innerhalb der Zelle ist seine Aufnahme in die Zelle, die deshalb auch eingehender behandelt werden soll.

### 4.2.1 TP-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit

Die Aufnahme von TP in Saccharomyceszellen erfolgt sehr rasch (Abb. 7). Mit steigender TP-Konzentration in der Inkubationslösung geht die Aufnahme nach einer Phase der linearen Abhängigkeit von der Zeit anschließend immer früher in die Sättigungsphase über.

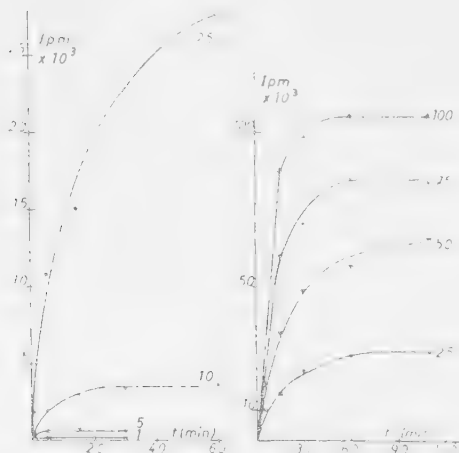


Abb. 7

Aufnahme von TP-H<sup>3</sup> in diploide Saccharomyceszellen in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen (in µg/ml) neben den Aufnahmekurven angegeben).

Unabhängig vom Ploidiegrad erreicht die TP-Konzentration in allen Zellarten unter gleichen Bedingungen etwa den gleichen Wert (Abb. 8). Bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  in der Außenlösung und einer Einwirkzeit von 60 min erhält man folgende Maximalwerte der TP-Aufnahme: haploid 0,9; diploid 1,5; tetraploid 3,3; hexaploid 4,7  $\mu\text{g} \cdot 10^{-8}$  TP/Zelle.

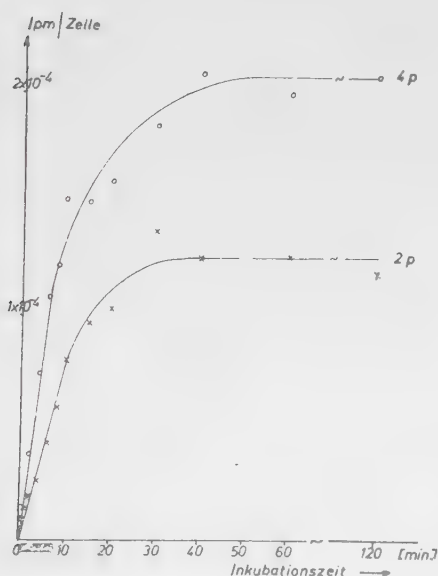


Abb. 8

Aufnahme von TP-H<sup>3</sup> in diploide (x) und tetraploide (o) Saccharomyceszellen in Abhängigkeit von der Zeit ( $c_a = 50 \mu\text{g/ml}$ ).

Die aufgenommene Menge entspricht rund 0,1 % des Trockengewichts der Zelle.

Werden Zellen vor der TP-Behandlung 2 Stunden in 0,1 M Glukose-Lösung inkubiert, so zeigt sich keine Steigerung der Aufnahmege-  
schwindigkeit gegenüber unvorbehandelten Zellen. Bei aktiv-transportierten Verbindungen (z. B. Purinen) erreicht man bei gleicher Behandlung eine starke Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit (WINTER 1972).

#### 4.2.2 Aufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur

Aus der Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von Substanzen in Zellen können Schlüsse über den Mechanismus des Transports gezogen werden. Liegt ein enzymkatalysierter Transport vor, so ist ein Maximum der Aufnahmegeschwindigkeit bei Temperaturen im physiologischen Bereich, zwischen  $25^{\circ}$  und  $40^{\circ}\text{C}$ , zu erwarten. Steigt die Aufnahmegeschwindigkeit jedoch bei Erhöhung der Temperatur auch über  $40^{\circ}\text{C}$  weiter an, kann geschlossen werden, daß nicht-enzymatischer Transport, z. B. Diffusion vorliegt.

Abb. 9 zeigt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit von TP mit steigender Temperatur ohne Ausbildung eines Maximums zunimmt. Die Aktivierungsenergie für die Aufnahme von TP beträgt  $7\text{kcal/Mol}$  (Abb. 9, Arrheniusdiagramm).

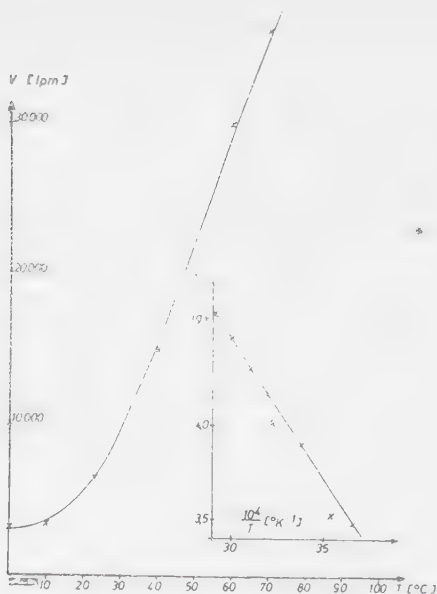


Abb. 9

Aufnahmegeschwindigkeit von TP-II<sup>3</sup> in diploide *Saccharomyces*-zellen bei verschiedenen Temperaturen und Darstellung dieser Werte im Arrheniusdiagramm.

( $c_a = 50\mu\text{g/ml}$ ; Inkubationszeit 2 min).

#### 4.2.3 Aufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration der TP-Lösung

##### 4.2.3.1 Kinetik der Aufnahme

Es wurde die Kinetik der TP-Aufnahme in einem Bereich von 0,5 - 420  $\mu\text{g/ml}$  bei diploiden Zellen untersucht. Aus Abb. 10 ersieht man, daß die Aufnahmegeschwindigkeit im gewählten Konzentrationsbereich keine Sättigung erreicht, wobei die Kurve in zwei Geraden unterschiedlicher Steigung ( $k_1 = 28$ ,  $k_2 = 8$ ) zerlegbar ist, die zeigen, daß die Aufnahmegeschwindigkeit bei Konzentrationen  $< 40 \mu\text{g/ml}$  stärker mit der Konzentration zunimmt als bei Konzentrationen  $> 40 \mu\text{g/ml}$ . Möglicherweise bilden sich bei hochkonzentrierten Lösungen TP-Aggregate, die die Zellwand schwerer passieren können als Einzelmoleküle.

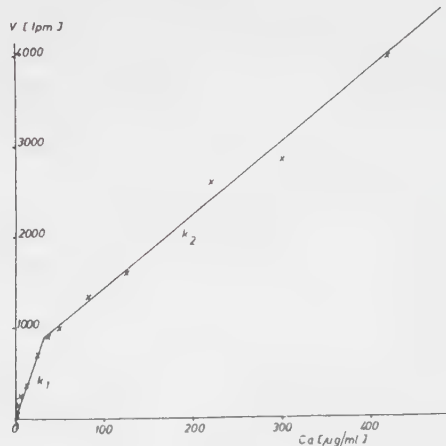


Abb. 10 Einfluß der Außenkonzentration auf die Aufnahmegeschwindigkeit von TP- $\text{H}^3$  in diploide *Saccharomyces*-zellen. (Inkubationszeit 1 min).

#### 4.2.3.2 Abhängigkeit der Konzentration an Farbstoff in der Zelle ( $c_i$ ) von der Konzentration der Inkubationslösung ( $c_a$ )

Kann aufgrund der Temperaturabhängigkeit und aus der Kinetik der TP-Aufnahme ein Transport durch "Carrier" als unwahrscheinlich angesehen werden, so interessiert, ob die Sättigung der Aufnahme bei Erreichen einer Innenkonzentration, die der jeweiligen Außenkonzentration entspricht (Diffusionsgleichgewicht), erreicht wird, oder ob gegen einen Konzentrationsgradienten die Aufnahme weiter gesteigert wird. Dies würde bedeuten - unter der Annahme, daß Diffusion vorliegt - daß TP in der Zelle an Zellkomponenten gebunden wird. Inkubiert man die diploiden Zellen bei verschiedenen Konzentrationen (1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) so lange, bis keine weitere Aufnahmesteigerung mehr erfolgt (Sättigung) und trägt die ermittelte Innenkonzentration  $c_i$  gegen die Außenkonzentration  $c_a$  auf, so erhält man Abb. 11, aus der ersichtlich ist, daß die Aufnahme bei  $c_a > 10 \mu\text{g/ml}$  über das Erreichen des Diffusionsgleichgewichts hinaus ( $c_i = c_a$ ) weiter gesteigert wird, d.h. der Farbstoff wird in der Zelle stark angereichert.

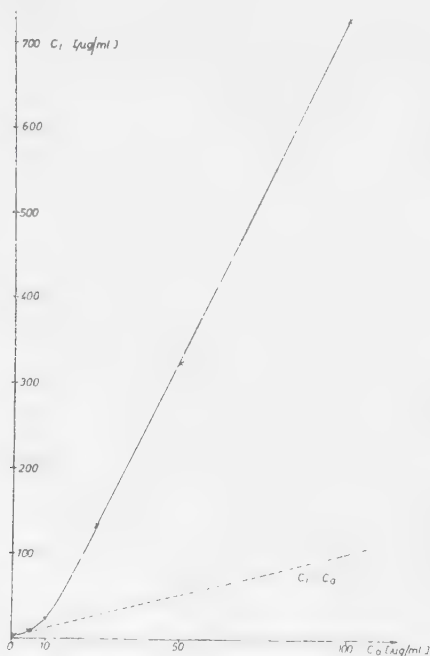


Abb. 11

Innenkonzentration  $c_i$   
an TP- $\text{H}^3$  nach Aufnah-  
mesättigung in Abhängig-  
keit von der Außenkonzen-  
tration der Inkubations-  
lösung  $c_a$ .

#### 4.2.4 Aufnahme in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Um reproduzierbare Ergebnisse bei der Untersuchung der Aufnahme von TP zu erhalten, wurde untersucht, ob Zellen aus verschiedenen Stadien des Wachstums unterschiedliche Aufnahme zeigen. Für Verbindungen, die als Vorstufen für die Synthese von Zellkomponenten verwendet werden, z. B. Nukleinsäurebasen, ist bekannt, daß die Aufnahme abhängig ist von der jeweiligen Syntheserate der Zellkomponenten, d. h. die Aufnahme ist meistens am größten in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase. Für TP, das im Stoffwechsel der Zelle nicht verwendet wird, könnte angenommen werden, daß sich keine starke Abhängigkeit der Aufnahme von der Wachstumsphase zeigt. Aus Abb. 12 ist jedoch ersichtlich, daß die Aufnahme in stationäre Zellen am größten und wesentlich vermindert in der Mitte der logarithmischen Phase ist.

Die Abhängigkeit der Aufnahme von der Wachstumsphase ist aus den bisherigen Untersuchungen nicht endgültig zu deuten. Es könnte an-

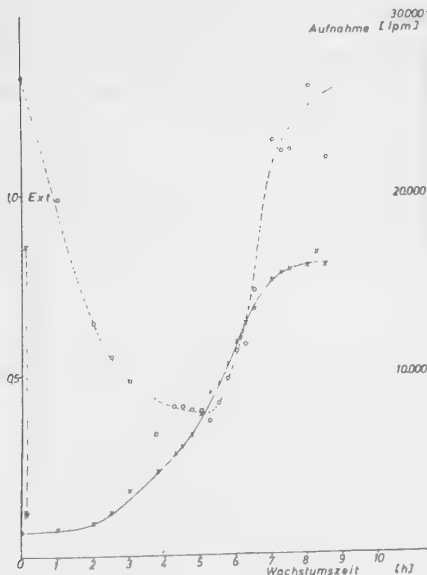


Abb. 12

Aufnahme von TP-H<sup>3</sup> in diploide Hefezellen bei verschiedenen Stadien der Wachstumsphase (c = 50  $\mu$ g/ml, Inkubationszeit 5 min).

x x x x x Wachstum der Zellen  
-o--o--o- Aufnahme von TP-H<sup>3</sup>

genommen werden, daß zur Zeit der größten Stoffwechselaktivität durch Aufnahme von im Stoffwechsel benötigter Substanzen die Diffusion von TP stark behindert wird. Möglicherweise sind auch Zellwandveränderungen während der logarithmischen Wachstumsphase für die unterschiedliche Aufnahme verantwortlich.

#### 4.3 Verteilung von TP-H<sup>3</sup> in der Saccharomyceszelle

Nachdem im vorigen Kapitel nachgewiesen worden ist, daß Saccharomyceszellen beträchtliche Mengen an TP aufnehmen und offensichtlich an Zellstrukturen binden, ist es interessant zu erfahren, wie sich der aufgenommene Farbstoff in der Zelle verteilt und an welche Zellkomponenten er sich eventuell bevorzugt bindet. Sehr unterschiedlich hohe Verteilung auf die einzelnen Zellkomponenten erlaubt ggf. Rückschlüsse über den Hauptwirkungsort des Farbstoffs und der photodynamischen Schädigung.

Diploide Saccharomyceszellen wurden mit TP-H<sup>3</sup>-Lösung versetzt (Besonderheiten siehe Tabelle 1) und anschließend sehr intensiv in Puffer gewaschen. Dann wurden die einzelnen Zellfraktionen isoliert (siehe Methoden), teilweise weiter gereinigt und die Menge an gebundenem TP-H<sup>3</sup> bestimmt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Man erkennt, daß die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen bei den nicht mit SDS behandelten Zellen (Versuch 1, 2, 3a) recht gut übereinstimmt. Der Hauptanteil der Radioaktivität ist in den Zelltrümmern zu finden, die aus Zellwand- und Membranfraktionen, Mitochondrien und eventuell aus einem geringen Prozentsatz nicht von Membranen abgelöster Ribosomen bestehen (genauere Untersuchungen über die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen der Zelltrümmer sind noch im Gange). Ribosomen- und Überstandsfraction sind wesentlich geringer markiert.

TABELLE I

| Versuchsnummer                                 | 1                                             | 2                  | 3a                  | 3b                         | 4                                                | 2                  | 3a                  | 3b                         |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| Zellzahl/Ansatz                                | $6 \times 10^9$                               | $6 \times 10^{10}$ | $16 \times 10^{10}$ | $16 \times 10^{10}$        | $7,5 \times 10^{10}$                             | $6 \times 10^{10}$ | $16 \times 10^{10}$ | $16 \times 10^{10}$        |
| $\mu\text{g TP-H}^3/\text{Ansatz}$             | $10^9$                                        | $2 \times 10^3$    | $10^3$              | $10^3$                     | $2 \times 10^3$                                  | $2 \times 10^3$    | $10^3$              | $10^3$                     |
| $\text{TP-H}^3\text{Konz. } [\mu\text{g/ml}]$  |                                               |                    |                     |                            |                                                  |                    |                     |                            |
| $\text{Rad.} = 0,032 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ | 100                                           | 100                | 10                  | 10                         | 100                                              | 100                | 10                  | 10                         |
| Inkubationszeit [min]                          | 60                                            | 30                 | 60                  | 60                         | 60                                               | 30                 | 60                  | 60                         |
| SDS-Behandlung:                                |                                               |                    |                     | mit SDS ho-<br>mogenisiert | 1h in<br>SDS<br>40-50°C                          |                    |                     | mit SDS ho-<br>mogenisiert |
| Fractionen:                                    | Prozentuale Verteilung der Radioaktivität [%] |                    |                     |                            | Spezifische Radioaktivität<br>[Imp/mg Zellmasse] |                    |                     |                            |
| Zelltrümmer                                    | 84,8                                          | 83,2               | 82,1                | 3,6                        | 6                                                | 1990               | 1210                | 142                        |
| Ribosomen                                      | 2,7                                           | 4,2                | 2,7                 | 2,3                        | 12                                               | 4190               | 530                 | 650                        |
| Überstandsfraction                             | 12,5                                          | 12,6               | 15,2                | 94,1                       | 82                                               | 1200               | 156                 | 725                        |

Betrachtet man die spezifische Radioaktivität, die gemessene Radioaktivität pro Masse der untersuchten Fraktion, zeigt sich, daß auch die Ribosomen neben den Zelltrümmern sehr stark mit radioaktivem TP besetzt sind. Dagegen ist die Überstandsfraction in normal behandelten Zellen am geringsten markiert.

Werden die Zellen mit SDS homogenisiert (Versuch 3b) oder die homogenisierten Zellen mit SDS erwärmt (Versuch 4), wird der größte Anteil der Radioaktivität aus den Zelltrümmern herausgelöst, der dann hauptsächlich in der Überstandsfraction erscheint. Nach einstündiger Erwärmung mit SDS werden außerdem Ribosomen freigesetzt, was sich in der Zunahme der Radioaktivität der Ribosomenfraction zeigt.

Säulenchromatographische Auftrennung der Überstandsfraction und Fällungsreaktionen mit TCA oder Äthanol zeigten, daß bei den nicht mit SDS behandelten Proben sich ungefähr 80 % der Radioaktivität im niedermolekularen Anteil befindet. Bei den SDS behandelten Proben enthielt die niedermolekulare Fraction im Überstand mengenmäßig ungefähr gleich viel Radioaktivität wie bei nicht SDS-behandelten Proben. Hinzu kam dann ein sehr großer Anteil hochmolekularer radioaktiver Partikel, so daß in diesem Fall rund 95 % der Radioaktivität der Überstandsfraction im hochmolekularen Anteil zu finden war.

Diese Ergebnisse sind folgendermaßen erklärbar: Mit der Aufnahme von TP wird ein sehr hoher Anteil zuerst in den Zellwand- und Membrananteilen gebunden. Wird außen sehr viel TP angeboten (Versuch 2), erhöht sich das Ausmaß der TP-Bindung an die Ribosomen beträchtlich; möglicherweise erst nach Absättigung der Bindungsstellen an Zellwand und -membran.

In den Zellwand- und Membranpartikeln scheint TP zum großen Teil an Proteine gebunden zu sein, die durch SDS herausgelöst werden. Die Bindung zwischen Protein und TP scheint dagegen von der SDS Behandlung wenig beeinflußt zu werden.

Die Bindung an DNS kann durch diese Versuche nicht beurteilt werden. Sie ist nicht auszuschließen, da in der nach SDS-Behandlung der Zell-

trümmer im Überstand erscheinenden hochmolekularen sehr radioaktiven Fraktion sich neben einem sehr hohen Anteil an Proteinen auch der größte Teil der Zell-DNS befindet. Da der DNS-Anteil im Verhältnis zur Proteinmenge sehr gering ist (nur 0,2 - 0,3 % des Trockengewichts einer Hefezelle besteht aus DNS), kann selbst eine sehr effektive DNS-Bindung wegen des geringen Anteils an Radioaktivität bezogen auf die Gesamtradioaktivität der Fraktion nicht deutlich nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde die TP-Bindung an DNS und an andere Nukleinsäuren *in vitro* untersucht.

#### 4.4 Bindung von TP an zelluläre Makromoleküle *in vitro*

Wie schon erwähnt, kann die Verteilung von TP- $H^3$  in der Zelle und das Ausmaß der Bindung an die einzelnen Komponenten wichtige Hinweise für den biologischen Wirkungsort von TP hinsichtlich der Dunkel- als auch der Hellinaktivierung liefern. Darüberhinaus ist es aufschlußreich, die Bindung an die einzelnen Substanzen näher zu charakterisieren.

Wie in Kap. 1 mitgeteilt wurde, können verschiedene Bindungstypen von Farbstoff an Nukleinsäure nachgewiesen werden. Es soll im folgenden Kapitel u. a. geprüft werden, ob auch TP verschiedene Arten von Bindungen mit Nukleinsäure eingehen kann. Wenn das der Fall wäre, müßte später geprüft werden, welche biologische Auswirkung die verschiedenen Bindungen haben und welche Rolle sie bei der photodynamischen Inaktivierung spielen.

Es sind viele Methoden zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der Bindungsarten bekannt und in der Literatur beschrieben worden. Es kristallisieren sich zwei Untersuchungsmöglichkeiten heraus:

Es wird die Änderung spezifischer Eigenschaften der Nukleinsäure oder

des Farbstoffs gemessen, um auf die Art und/oder auf das Ausmaß der Farbstoff/Nukleinsäure-Bindung zu schließen.

Im folgenden Kapitel werden

- 1) spektrophotometrische Untersuchungen, die die Änderung des Absorptionsverhaltens von TP durch Nukleinsäure-Zusätze beinhalten,
  - 2) Hitzedenaturierungsversuche, die physikalisch-chemische Veränderungen der Nukleinsäure durch TP-Bindung aufzeigen und
  - 3) Dialyseversuche zur quantitativen Beschreibung des Bindungsverhaltens
- vorge stellt.

#### 4.4.1 Spektrophotometrische Untersuchungen

Aus den Veränderungen des Spektrums des freien Farbstoffs nach Zugabe von Substanzen kann man Rückschlüsse über die Art der Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und diesen Verbindungen ziehen und ggf. quantitative Aussagen über das Bindungsverhältnis machen.

##### 4.4.1.1 Bindung an native DNS

Abb. 13 zeigt einen Teil aus dem sichtbaren Bereich des TP-Spektrum. Man erkennt, daß sich das TP-Spektrum nach Zugabe von DNS zur TP-Lösung verändert. Mit steigendem DNS-P/TP-Verhältnis nimmt zuerst die optische Dichte bei  $564 \text{ m}\mu$  ab und gleichzeitig verschiebt sich das Maximum geringfügig zu kürzeren Wellenlängen hin. Der Dimeren-"peak" bei  $535 \text{ m}\mu$  nimmt zu (Blauverschiebung des Spektrums  $\beta$ -Bande; MICHAELIS 1947). Bei Überschuß an DNS verschiebt sich die maximale Extinktion um  $10 \text{ m}\mu$  zu längeren Wellenlängen hin und nimmt stark zu (Rotverschiebung des Spektrums,  $\alpha$ -Bande, MICHAELIS 1947). Die Änderung der optischen Dichte bei  $572 \text{ m}\mu$  und der Wellenlänge des Maximums mit steigendem DNS-P/TP Verhältnis ist außerdem in Abb. 14 dargestellt. Das oben beschriebene Verhalten wird

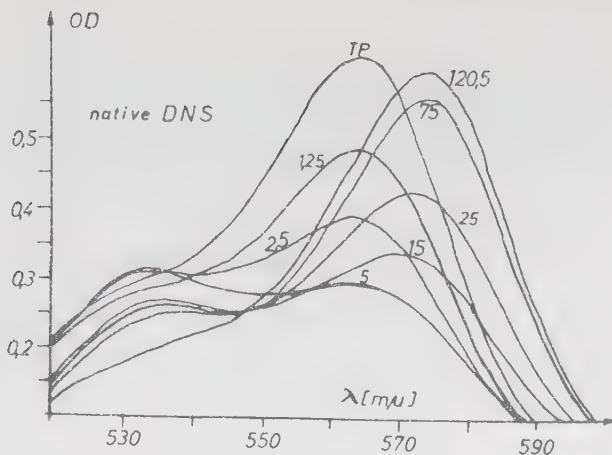


Abb. 13 Spektrale Verschiebungen im sichtbaren Teil des TP-Spektrums nach Zugabe steigender Mengen nativer DNS.  
An den Kurven ist das zugehörige molare DNS-P/TP-Verhältnis angegeben.  
NaCl: 0,01 M.

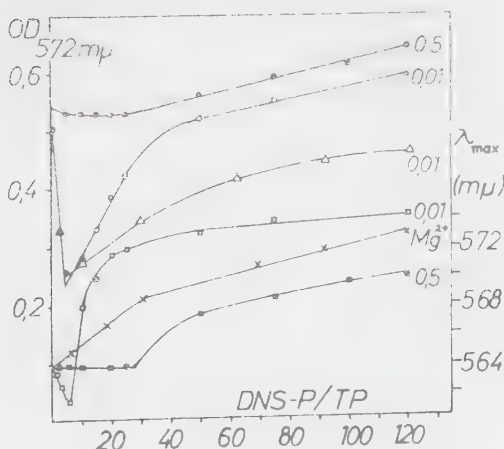


Abb. 14 Änderung der Extinktion  $_{572\text{ m}\mu}$  (die oberen 3 Kurven) und der Wellenlänge des  $_{572\text{ m}\mu}$  Maximums der  $\alpha$ -Bande (die unteren 3 Kurven) mit zunehmendem DNS-P/TP-Verhältnis.  
Die NaCl-Konzentrationen (M) sind neben den Kurven angegeben.  $\text{Mg}^{2+}$ : 0,5 mM, NaCl: 0,01 M.  
Für die  $\triangle$  : denaturierte DNS,

bei jeweils gleichem DNS-P/TP-Verhältnis nicht wesentlich von der TP-Konzentration beeinflusst. Aus Abb. 15 ist ersichtlich, daß bei allen TP-Konzentrationen die optische Dichte bis zu einem DNS-P/TP Verhältnis von 5 stark abnimmt und dann bis zu einem DNS-P/TP von ungefähr 25 linear ansteigt.

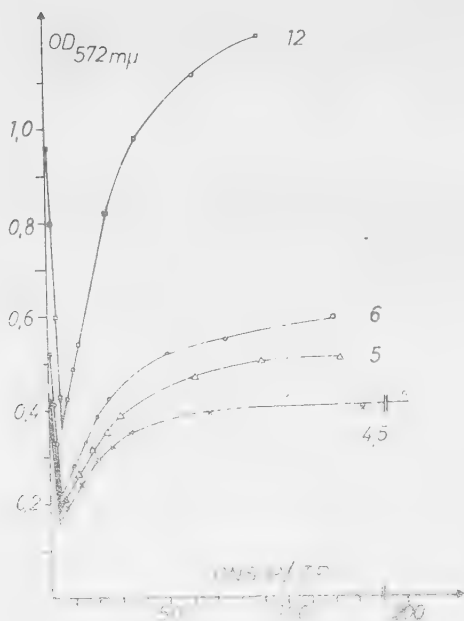


Abb. 15

Einfluß der TP-Konzentration auf die Innenbindung von TP in native DNS.

Die verwendeten TP-Konzentrationen sind neben den Kurven in ( $\mu$  M) angegeben.

NaCl: 0,01 M.

ene Verhalten hat die Ionenstärke. Steigende Na<sup>+</sup>-Konzentrationen (0,01M  $\rightarrow$  0,05 M) verhindern zunehmend die Blauverschiebung, d. h. die  $\beta$ -Bande wird immer weniger deutlich ausgebildet. Auch nimmt das Ausmaß der Rotverschiebung ab ( $\lambda_{\max}$  in Abb. 14). Wesentlich stärker als einwertigen Ionen wirken zweiwertige, wie z. B. Mg<sup>2+</sup>. Schon bei tausend-

fach geringerer Konzentration (0,5 mM) wird die Blauverschiebung völlig verhindert und die Zunahme der optischen Dichte bei 572 m $\mu$  reduziert.

#### 4.4.1.2 Bindung an degradierte DNS

Gleiche Versuche mit degradierter DNS zeigen keine spektralen Verschiebungen, sondern nur eine schwache Abnahme der optischen Dichte bei 564 m $\mu$ .

#### 4.4.1.3 Bindung an tRNS

Abb. 16 zeigt, daß Zugabe von geringen Mengen Hefe-tRNS zu TP-Lösungen zu einer starken Abnahme der optischen Dichte bei 564 m $\mu$  führt, wie sie auch nach Zugabe vergleichbarer DNS-Mengen beobachtet wurde.

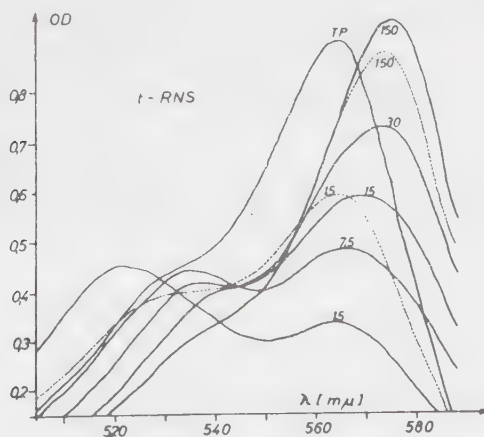


Abb. 16 Einfluß steigender Mengen tRNS auf das TP-Spektrum. Ausbildung einer  $\alpha$ -Bande (575 m $\mu$ ),  $\beta$ -Bande (535 m $\mu$ ) und  $\gamma$ -Bande ( $\sim$  520 m $\mu$ ). Das tRNS-P/TP Verhältnis ist neben den Kurven angegeben

————— NaCl: 0,01 M  
 - - - - - NaCl: 0,1 M

Außerdem erscheint ein neuer "peak" bei ungefähr  $520 \text{ m}\mu$ , die  $\gamma$ -Bande (MICHAELIS 1947). Die bei Erhöhung der tRNS-Konzentration eintretende Rotverschiebung des TP-Maximums beträgt ungefähr  $11 \text{ m}\mu$  (Abb. 17). Gleichzeitig verschwindet die  $\gamma$ -Bande zugunsten der  $\beta$ -Bande bei  $535 \text{ m}\mu$ . In  $0,1 \text{ M NaCl}$ -Lösung wird die  $\gamma$ -Bande unterdrückt und die  $\beta$ -Bande geringer ausgebildet. Der Einfluß hoher Ionenstärken auf die tRNS-TP-Bindung ist also ähnlich wie auf die DNS-TP-Bindung: bei beiden wird die Blauverschiebung d.h. die Außenbindung des Farbstoffs am stärksten beeinflusst.

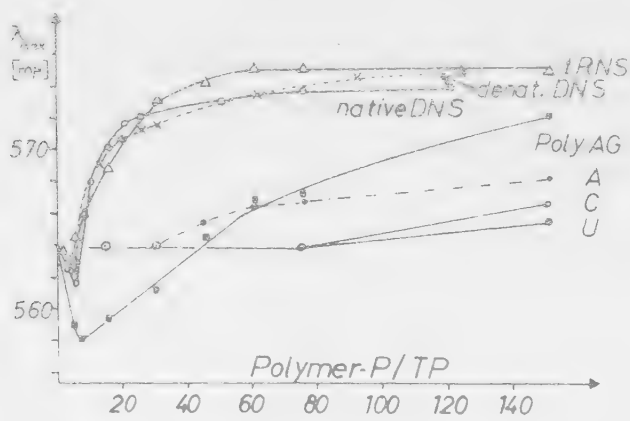


Abb. 17 Verschiebungen des Absorptionsmaximums der  $\mathcal{L}$ -Bande verschiedener Polymer-TP-Systeme in Abhängigkeit vom Polymer-P/TP-Verhältnis. NaCl:  $0,01 \text{ M}$ .

#### 4.4.1.4 Bindung an denaturierte DNS

Im Gegensatz zur TP-Bindung an native DNS nimmt die optische Dichte bei  $572 \text{ m}\mu$  unter identischen Bedingungen ( $\mu = 0,01$ ) mit steigendem DNS-P/TP Verhältnis schwächer zu und erreicht nicht so hohe End-

werte (Abb. 14).

Die Änderung der Wellenlänge des Maximums ist vergleichbar mit der Änderung, die bei der TP/DNS- und TP/tRNS-Bindung auftritt (Abb. 17).

#### 4.4.1.5 Bindung an PolyA, PolyU, PolyC und PolyAG

Bei allen untersuchten Polynukleotiden (PolyA, PolyU, PolyC, PolyAG;  $\mu = 0,01$ ) zeigt sich, daß auch sie nach Zugabe zu TP-Lösungen das TP-Spektrum beeinflussen (Abb. 18 - 21, 17):

Abnahme der optischen Dichte bei 564 m $\mu$ , Blau- und Rotverschiebung. Die einzelnen Schritte ereignen sich bei den einzelnen untersuchten Polynukleotiden jedoch bei unterschiedlichen Polymer-P/TP-Verhältnissen.

Besonders in den Spektren von TP mit PolyU und PolyAG ist auf den ersten Blick kein systematischer Gang zu erkennen. Sie setzen sich wahrscheinlich aus einer Vielzahl verschiedener Einzelspektren zusammen, deren Anteil am Gesamtspektrum je nach Polymer-P/TP-Verhältnis unterschiedlich ist.

Bei Bindung von TP mit allen diesen Polymeren erscheint bei TP-Überschuß eine ausgeprägte Bande - besonders auffallend bei PolyC- und bei höherem Polymer-P/TP-Verhältnis nimmt die optische Dichte mit einhergehender schwacher Rotverschiebung nur bei PolyA in einem den untersuchten biologischen Polymeren tendenziell vergleichbarem Maße zu.

#### 4.4.1.6 Zusammenfassung der Bindungsversuche an Nukleinsäuren

Analoge spektrale Verschiebungen bei Zugabe von Biopolymeren zu Proflavin-Lösungen sind bereits beschrieben worden. Mit Hilfe anderer Untersuchungsmethoden konnte gezeigt werden, daß den Rot- und Blauverschiebungen bestimmte Bindungsarten zwischen Proflavin und

Abb. 18 und 19, 20 und 21 s. Seite 58

Spektrale Verschiebungen im sichtbaren Teil des TP-Spektrums durch Wechselwirkung von TP mit verschiedenen synthetischen Polynukleotiden. Das Polymer-P/TP Verhältnis ist neben den zugehörigen Kurven angegeben. NaCl: 0,01 M.

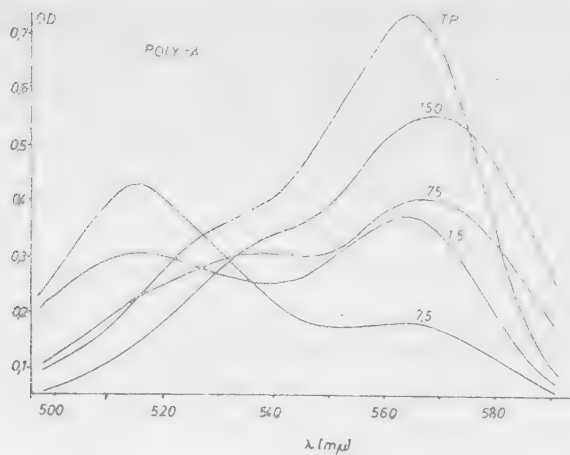


Abb. 18 PolyA

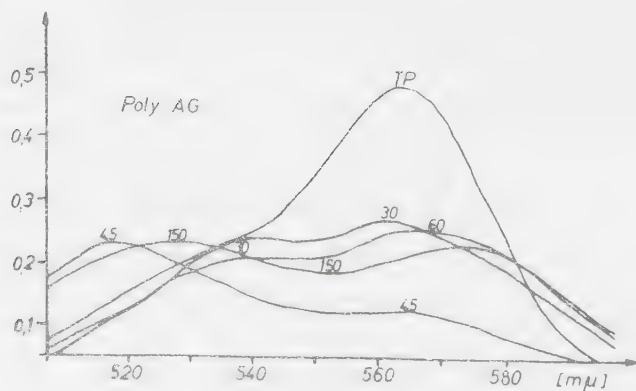


Abb. 19 PolyAG

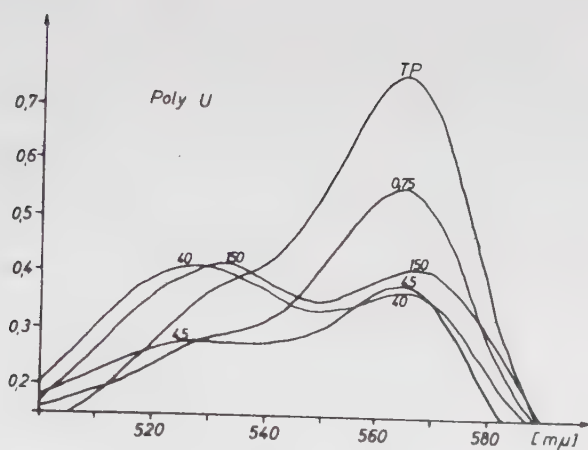


Abb. 20 Poly U

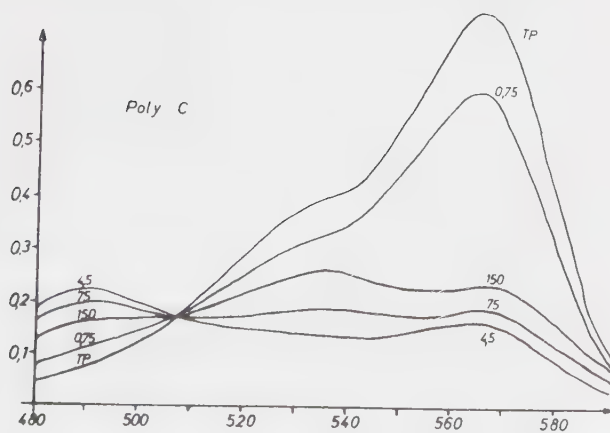


Abb. 21 Poly C

Polymer entsprechen (vgl. Kap. 1).

Es ist anzunehmen, daß das bei TP beobachtete spektrale Verhalten nach Bindung an Biopolymere mit dem von Proflavin und anderen Farbstoffen unter gleichen Bedingungen vergleichbar ist und auf dieselben Ursachen zurückzuführen ist. Demnach ist zu folgern, daß TP zwei Arten von Bindung mit verschiedenen Polynukleotiden eingeht.

Bei hohem Polymer/TP-Verhältnis ist fast ausschließlich die starke Bindung als Rotverschiebung nachweisbar, was zeigt, daß sie zuerst ausgebildet wird. Der enge Kontakt von TP mit den Basen kann bei der nativen DNS und partiell bei der tRNS und denaturierten DNS zur Interkalation zwischen benachbarte Basenpaare führen; bei den ungepaarten Teilen der tRNS und denaturierten DNS und bei PolyA zur Interkalation zwischen benachbarte Basen.

Die stärkste Tendenz zur Ausbildung der starken Bindung unter den synthetischen Polynukleotiden zeigt PolyA, was wohl auf die geordnete Struktur des Polymers zurückzuführen ist (Basen"stacking").

Für die anderen synthetischen Polynukleotide ist aus diesen Ergebnissen nicht abzuleiten, daß sie mit TP vergleichbare Innenbindungen eingehen.

Nach Absättigung der starken Bindung werden die TP-Kationen zunehmend an die negativen Phosphatgruppen des Polynukleotids gebunden, was sich im Auftreten der  $\beta$ -Banden bemerkbar macht.

Je nach sterischen Bedingungen des Polymers können die außen gebundenen TP-Moleküle untereinander in intensive elektronische Wechselwirkung treten (stacking); dies wird durch das Auftreten der  $\gamma$ -Bande nachweisbar. Das "stacking" konnte bei der relativ flexiblen tRNS nachgewiesen werden, nicht aber bei der DNS, die einen niedrigen stacking-Koeffizienten besitzt (STONE und BRADLEY 1961).

Die Stärke des Auftretens der beiden Bindungsarten hängt von der sterischen Konfiguration des Polymers ab: z. B. keine spektralen Verschiebung mit degradiertem DNS, kein "stacking" an DNS, keine Innenbindung mit PolyU oder PolyC (PolyAG?), verminderte Innenbindung an

denaturierte DNS.

Vor allem die Außenbindung, die durch elektrostatische Anziehung realisiert wird, ist durch hohe Konzentrationen einwertiger Kationen reduzierbar. Dadurch wird auch das "stacking" unterdrückt. Zweiwertige Kationen sind schon in tausendfach geringerer Konzentration ebenso effektive Hemmstoffe. Die Innenbindung wird ebenfalls reduziert, vor allem durch  $Mg^{2+}$ . Wahrscheinlich wird die Insertionsreaktion sterisch behindert (LI und CROTHERS 1969a).

#### 4.4.1.7 Bindung an Albumin

Ansteigende Mengen von Albumin aus Rinderserum, die zu TP-Lösungen gegeben wurden, verursachten eine kontinuierliche Abnahme der optischen Dichte bei  $564\text{ m}\mu$ . Im Gegensatz zu den Versuchen mit Nukleinsäuren wurden keine spektralen Verschiebungen beobachtet. Die Bindung ist sehr schwach, halbmaximale Sättigung ist erreicht, wenn  $10\text{ }\mu\text{ Mol TP}$  mit  $1\text{ mg Albumin}$  gebunden sind. Weitere Bindungsversuche mit Proteinen, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, sind geplant, um genauere Aussagen über die Bindungsverhältnisse Farbstoff/Protein machen zu können.

#### 4.4.1.8 Bindung an Hefe-Ribosomen

Zugabe steigender Mengen frisch isolierter Heferibosomen zu TP-Lösungen resultiert in einer starken Abnahme der optischen Dichte bei  $564\text{ m}\mu$  bei gleichzeitiger Ausbildung eines "peaks" bei  $523\text{ m}\mu$  (Abb. 22). Weitere Zugabe von Ribosomen bewirkt eine Verschiebung der Wellenlänge des Maximums zu längeren Wellenlängen hin und eine Zunahme der Extinktion bei diesen Wellenlängen ( $\lambda_{\text{max}}$ :  $564\text{ m}\mu$  auf ungefähr  $568\text{ m}\mu$ ).

Das beobachtete spektrale Verhalten von TP nach Bindung an Ribosomen erinnert stark an eine Bindung an Nukleinsäuren.

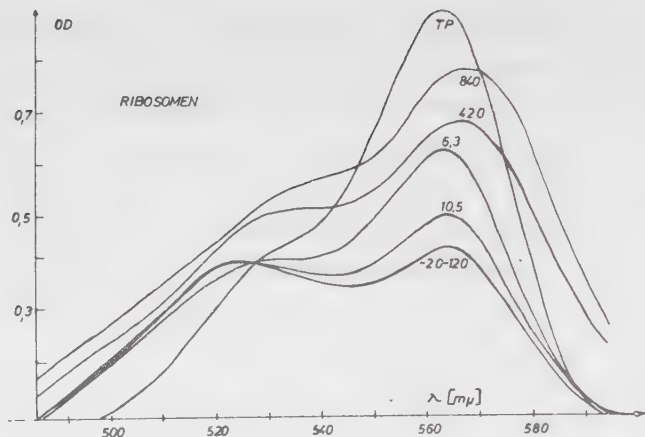


Abb. 22 Einfluß von Heferibosomen auf den sichtbaren Bereich des Absorptionsspektrums von TP.  
Neben den Kurven ist das jeweilige Verhältnis von Ribosomenmasse (mg/ml) zu TP-Menge angegeben. Puffer:  
1,5 mM Tris-Acetat pH 7.5  
0,425 mM Mg-Acetat  
1,1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Es kann daher angenommen werden, daß TP sich stark an die rRNS bindet. Über die Bindung von TP an das Ribosomenprotein kann anhand dieser Versuche keine Aussage gemacht werden.

#### 4.4.2 Hitzedenaturierungsversuche mit unbestrahlten und bestrahlten TP-DNS-Komplexen

##### 4.4.2.1 Unbestrahlte Komplexe

In DNS interkalar eingelagerter Farbstoff stabilisiert die DNS (vgl. Kap. 1). Um einen weiteren Hinweis für die interkalare Einlagerung von TP in die DNS zu erhalten, wurden die Schmelzpunkte von Lachsperma-DNS-Proben, die mit unterschiedlich hohen TP-Mengen ge-

bunden sind, bestimmt.

Abb. 23a zeigt den typischen kooperativen Verlauf der thermischen Denaturierung von Lachssperma-DNS. Der  $T_m$ -Wert beträgt  $70,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  bei  $0,007\text{ M NaCl}$ . Zugabe steigender Mengen TP erhöht den Schmelzpunkt zunehmend. Um die einzelnen Schmelzkurven besser vergleichen zu können, wurden sie auf dieselbe Ausgangsextinktion bezogen. Die linear mit der TP-Konzentration zunehmende Stabilisierung gegen thermische Denaturierung zeigt auch Abb. 23b. Nach Erreichen eines TP/DNS-P-Verhältnisses von ungefähr  $10^{-1}$  beeinflusst weitere TP-Zugabe den Schmelzpunkt kaum mehr. Dies entspricht einem DNS-P/TP-Verhältnis von  $\approx 10$ ; bei diesem ist in der spektrophotometrischen Darstellung die Innenbindung gerade noch nachweisbar. Weiterhin gebundenes TP stabilisiert die DNS nicht weiter, analog beginnt bei diesem Polymer/TP-Verhältnis die Außenbindung sichtbar zu werden.

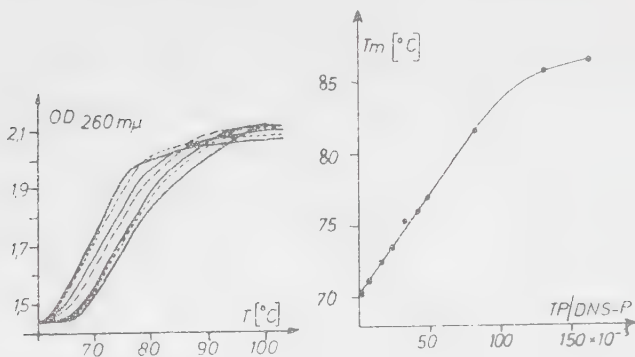


Abb. 23    Einfluß von TP auf die Hitzedenaturierung von Lachssperma-DNS. NaCl: 7mM.  
(Näheres siehe Text)

Vergleicht man die Spektren der TP-DNS-Komplexe bei 25°C und bei 98°C, zeigt sich, daß die Wellenlänge des Maximums von 574 m $\mu$  bei 25°C auf 565-566 m $\mu$  bei 98°C gefallen ist, und daß bei 98°C keine  $\beta$ -Bande nachweisbar ist.

Das bedeutet, daß bei hohen Temperaturen die Außen- und die Innenbindung von TP an DNS nicht mehr nachweisbar ist.

(Daraus kann aber nicht geschlossen werden, daß für die Innenbindung die helicale Sekundärstruktur der nativen DNS Voraussetzung ist).

#### 4.4.2.2 Bestrahlte Komplexe

Vor der thermischen Denaturierung wurden die DNS/TP-Komplexe (TP/DNS-P = 0,016; 0,049) und reine DNS mit sichtbarem Licht (200 W) im Abstand von 20 cm 1 Stunde bei 4°C oder bei 24°C bestrahlt. Es wurde erwartet, daß sich der T<sub>m</sub>-Wert der bestrahlten Probe gegenüber dem der unbestrahlten verringert, da bei photodynamischer Einwirkung auf Nukleinsäuren Guanin angreift und zerstört (LOCHMANN et al. 1964; CHANDRA und WACKER 1966a; DELLWEG und OPRÉE 1966; SINGER und FRAENKEL-CONRAT 1966; BERG und BÄR 1967). Durch Zerstörung des Pyrimidinringes im Guanin-Molekül wird auch die Wasserstoff-Brückenbindung zwischen Guanin und Thymin aufgespalten, was zu einer Destabilisierung der DNS und somit auch zu erhöhter thermischer Angreifbarkeit führen müßte.

In den bisher durchgeführten Versuchen konnte keine Schmelzpunktänderung der bestrahlten gegenüber den unbestrahlten Komplexen festgestellt werden.

Das mag daran liegen, daß die Guaninzerstörung erst bei höheren TP/DNS-P-Verhältnis nachweisbar wird. Vielleicht ist auch die Bestrahlungszeit zu kurz gewählt.

#### 4.4.3 Dialyse

Zur quantitativen Beschreibung der DNS-TP-Bindung wurde für erste Versuche als Methode die Gleichgewichtsdialyse gewählt. Dabei werden

eine konstante Menge DNS gegen verschiedene TP-Konzentrationen oder verschiedene DNS-Konzentrationen gegen eine konstante TP-Konzentration bis zum Gleichgewicht (ca. 60 Stunden) dialysiert und anschließend die Menge gebundenes TP/DNS-P ( $r$ ) bestimmt (vgl. Kap. 3).

Das bei Zimmertemperatur gemessene Ausmaß der Bindung beträgt ca. 0,9 Mol TP/Mol Nukleotid (Abb. 24). Das bedeutet, daß im Bereich der Außenbindung ein TP-Molekül auf ungefähr 0,5 Basenpaare kommt oder ungefähr an jedem Phosphatmolekül ein Molekül TP bindet. TP bindet also ähnlich effektiv mit DNS wie z. B. Proflavin (PEACOCKE und SKERRETT 1956).

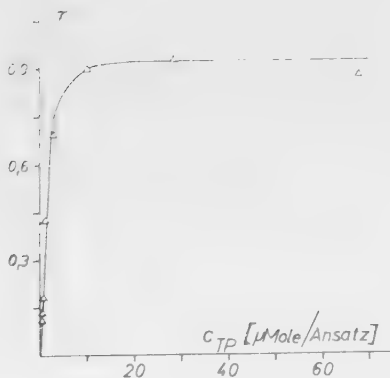


Abb. 24

Ausmaß der TP-Bindung  
an Kalbsthymus-DNS.  
Dialyseversuch - NaCl:  
0,01 M.

$r$  = Mole gebundenes TP /  
Mole Nukleotid

#### 4.5 Dunkel- und Hellwirkung von TP auf ein zellfreies Protein synthetisierendes System

Es konnte gezeigt werden, daß TP in die Zelle eindringt und an Zellwand- und Membranbestandteile, an Ribosomen und an Komponenten der Überstandsfraktion gebunden wird. Bindungsversuche in vitro ergaben, daß TP außer an Proteine besonders an Nukleinsäuren sehr effektiv bindet.

Es konnte aber mit Hilfe dieser Ergebnisse noch nicht entschieden werden, welche Auswirkung diese Bindung auf die biologische Funktion der einzelnen Zellkomponenten hat. Um das zu testen, wurde die Funktionsfähigkeit einzelner Zellbestandteile nach TP-Einwirkung im Dunkeln und nach photodynamischer Behandlung in einem zellfreien Protein synthetisierenden System aus *Saccharomyces*-Komponenten überprüft.

#### 4.5.1 Dunkelwirkung von TP auf das Gesamtsystem

Alle Komponenten des zellfreien Protein synthetisierenden Systems - außer  $\text{Phe-C}^{14}$  - wurden 15 min im Dunkeln mit verschiedenen Mengen TP inkubiert. Alle Vorbehandlungen wurden bei  $0^\circ\text{C}$  (im Eisbad) ausgeführt, um eventuell schon vor der Bebrütung ablaufende Reaktionen, die die zugegebene Energie verbrauchen würden, weitgehend zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde  $\text{Phe-C}^{14}$  hinzugegeben und das System bei  $30^\circ\text{C}$  bebrütet.

In Abb. 25 b ist die Syntheserate des Systems bei den verschiedenen TP-Konzentrationen aufgetragen.

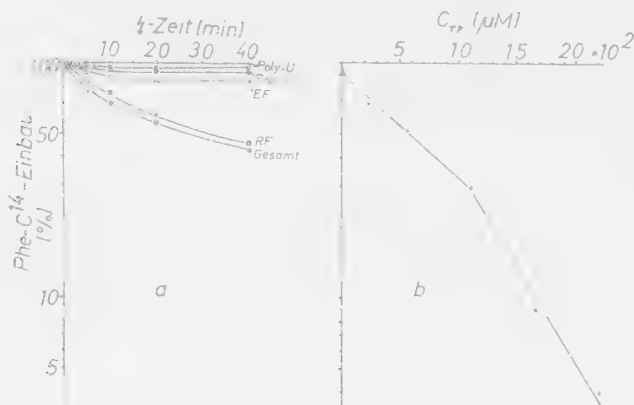


Abb. 25 Photodynamische Wirkung (a) und Dunkelwirkung (b) von TP auf die Proteinsynthese in vitro.

a) Endkonzentration an TP während der Bestrahlung:  
22 μM.

Für die Untersuchungen zum photodynamischen Effekt wurde nach diesen Ergebnissen eine TP-Konzentration von  $22 \mu\text{M}$  gewählt, weil bei dieser die Dunkelwirkung verhältnismäßig gering ist.

#### 4.5.2 Photodynamische Wirkung auf das Gesamtsystem und seine Komponenten

Entweder alle Komponenten außer der radioaktiven Aminosäure oder einzelne Komponenten wurden mit TP ( $c_e$  ( $\mu\text{M}$ ): 22; 110, 220) inkubiert und dann mit einer 200 W-Lampe im Abstand von 30 cm bei  $0^\circ\text{C}$  bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die radioaktive Aminosäure hinzugegeben und das System bei  $30^\circ\text{C}$  60 min bebrütet.

Abb. 25a zeigt die Proteinsyntheserate nach Bestrahlung des Gesamtsystems oder einzelner Komponenten. Die Werte wurden jeweils prozentual auf die Syntheseleistung des Systems nach Dunkeleinwirkung von TP derselben Konzentration bezogen. Es wird deutlich, daß nach Bestrahlung des Gesamtsystems und nach Bestrahlung der Ribosomen die Syntheserate des Systems mit zunehmender eingestrahelter Dosis etwa gleich stark verringert wird. Photodynamische Behandlung von PolyU, PolyC oder der Enzymfraktion sowie des Energie liefernden Systems (nicht abgebildet) bedingen nur einen geringfügigen Aktivitätsverlust.

Der Einfluß von TP und Licht wurde auf eine Teilreaktion der Proteinsynthese, auf die Aminoacylierung, gesondert geprüft ( $c_e = 22 \mu\text{M}$ ;  $0^\circ\text{C}$ ; 200 W, 30 cm). Es konnte keine Hemmung der Aminoacylierung - getestet bis zu 20 min Bestrahlungszeit - festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist nicht ohne weiteres zu erwarten, da anzunehmen ist, daß die nachgewiesene gute Bindung zwischen tRNS und TP auch auf die Beladungsreaktion (eventuell wegen Konformationsänderung der tRNS) Einfluß haben sollte. Die Hemmung der Aminoacylierungsreaktion nach Dunkel- und Helleinwirkung verschiedener Farbstoffe wird u.a. von

LANDEZ und ROSKOSKI (1969), LURQUIN und BUCHET-MAHIEU (1971), von TSUGITA und Mitarbeitern (1965), KUWANO und Mitarbeitern (1968) und von AMAGASA und ITO (1970) nachgewiesen. Da es möglich ist, daß nur die Reaktionsrate der Aminoacylierung nicht aber das Ausmaß der Reaktion durch photodynamische Behandlung beeinträchtigt wird, sollen weitere Versuche - auch unter Verwendung höherer TP-Konzentrationen - zur Kinetik der Reaktion durchgeführt werden. Da auch die Farbstoffbindung an die einzelnen tRNS-Spezies unterschiedlich hoch sein kann, soll die Aminoacylierungsreaktion noch mit anderen Aminosäuren getestet werden.

Da die photodynamische Behandlung der Ribosomen die Proteinsynthese etwa gleichstark hemmt wie die photodynamische Behandlung des Gesamtsystems, ist anzunehmen, daß die Schädigung des Gesamtsystems hauptsächlich auf die photodynamische Inaktivierung seiner Ribosomen und kaum auf die Schädigung der anderen Komponenten zurückzuführen ist. Weitere Versuche werden klären, ob die funktionelle Beeinträchtigung der Ribosomen durch Photooxidation der rRNS oder der Proteine (oder beider Bestandteile) verursacht wird. GARVIN und Mitarbeiter (1969) zeigen für die durch Bengalrosa sensibilisierte Photooxidation von *E. coli* Ribosomen, daß die Ribosomenproteine und nicht die rRNS angegriffen werden.

Um eine Korrelation zwischen der Art der Bindung von TP an die Komponenten und dem Ausmaß der photodynamischen Reaktion ermitteln zu können, sollte zunächst der Einfluß der TP-Konzentration auf die photodynamische Inaktivierungsrate getestet werden.

Es konnte aber in keinem Falle eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit des photodynamischen Effekts im untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Das kann darauf zurückzuführen sein, daß die photodynamische Inaktivierung vom Ausmaß der Dunkelinaktivierung beeinflusst wird: Sie wirkt sich am stärksten bei geringer Dunkelinaktivierung aus. Da bei den verwendeten TP-Konzentrationen (22, 110, 220  $\mu\text{M}$ ) und bei den unterschiedlich hohen Aktivitäten der einzelnen

Systeme die Werte der Dunkelinaktivierung jedoch sehr schwankten, war eine Abhängigkeit des photodynamischen Effekts von der TP-Konzentration nicht eindeutig nachweisbar. Weitere Versuche unter verbesserten standardisierten Bedingungen sind zur Klärung des Problems notwendig.

Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen, in denen die Ribosomen und Enzyme erst nach ihrer Isolierung mit TP inkubiert wurden, wurden die Ribosomen und Enzymfraktionen aus Zellen isoliert, die vorher mit TP ( $c_e = 220 \mu\text{M}$ ) 90 min inkubiert waren. Einsatz dieser "roten" Ribosomenfraktionen reduzierte den Phe- $\text{C}^{14}$ -Einbau bis auf 15-25% des Einbaus der Kontrolle mit "weißen" Ribosomen. Die rote Enzymfraktion verminderte den Einbau nicht. Photodynamische Behandlung beider Fraktionen hatte keine Wirkung. Weitere Versuche mit Zellen, die geringere Mengen an TP aufgenommen haben, sind geplant.

Letztere Untersuchungen haben den Vorteil, eventuell konkrete Rückschlüsse über die biologische Relevanz der photodynamischen Inaktivierung einzelner Komponenten (in vivo) ziehen zu können; denn es ist möglich, mit den Zellen desselben Ansatzes vergleichend z.B. stoffwechselphysiologische Untersuchungen (in vivo) zu machen.

Allerdings sind Vergleiche zwischen der Syntheserate eines PolyU abhängigen Systems und einzelner Syntheseleistungen ganzer Zellen -z.B. der Proteinsynthese - nur sehr vorsichtig zu ziehen. In einem PolyU abhängigen System wird lediglich die Funktionsfähigkeit einzelner Komponenten, PolyPhe zu synthetisieren, getestet. Die Funktionsfähigkeit des Produkts muß unberücksichtigt bleiben.

Erst in einem System, das von natürlichem Messenger oder von DNS abhängig ist, kann eine Kontrolle des Produkts erfolgen. Der Zelle nützt eine Proteinsynthese nur, wenn sie vollständig und richtig verläuft. Fehler, wie z.B. Einbau falscher Aminosäuren, vorzeitiger Aminosäure-Kettenabbruch oder falsche Regulation der Synthese, wie sie im PolyU System nicht nachweisbar sind, können zum Absterben der Zelle führen.

Abschließend ist zu bemerken, daß die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse mehr qualitativ als quantitativ gewertet werden müssen. Zur genauen quantitativen Erfassung muß das System besser standardisiert werden: die Abhängigkeit des Einbaus von den einzelnen Fraktionen darf nicht stark schwanken, so daß auch die Dunkelwirkung konstante Werte erreicht. Das gestattet, die Dunkelwirkung und die photodynamische Wirkung besser zu trennen und zu analysieren. Um den sicherlich interessanten photodynamischen Einfluß auf die tRNS testen zu können, muß die tRNS für das System essentiell sein, was bisher nur sehr begrenzt der Fall ist.

Diese Verbesserungen werden in der Arbeitsgruppe gerade entwickelt und durchgeführt. Auch ein DNS abhängiges System wird aufgebaut. Hier könnte der Einfluß der starken und schwachen Bindung auf die Transkription und auf die photodynamische Inaktivierung der DNS besonders gut getestet werden.

#### 4.6 Photodynamische Inaktivierung von RNS- und Proteinsynthese in vivo

Die Bindung von TP kann Zellbestandteile funktionell beeinträchtigen. Sichtbares Licht wirkt dabei zusätzlich inaktivierend oder kann bereits in Gegenwart sehr niedriger TP-Konzentrationen, die allein in Dunkeln nicht schädigend wirken, Veränderungen auslösen.

Nachdem in Kap. 4.4 gezeigt wurde, daß TP sehr effektiv mit DNS in vitro bindet, soll jetzt geprüft werden, ob diese Bindung bei Hefezellen auch in vivo realisiert wird, indem die Funktionsfähigkeit der DNS nach Einwirkung von TP und Licht getestet wird.

Diese Untersuchungen sind besonders interessant um die Annahme einiger Autoren, die photodynamische Schädigung der DNS sei die relevante Ursache für das Absterben der Zelle, für die Hefezelle zu überprüfen, da sich bereits verschiedene Versuchsergebnisse nicht mit dieser Theorie erklären lassen (vgl. Kap. 1).

Eine Möglichkeit den Einfluß der Dunkel- und Hellwirkung von TP auf das genetische Material zu prüfen, ist der Vergleich der Schädigung von Stoffwechselleistungen der Zelle nach Röntgenbestrahlung mit der nach Dunkel- und Helleinwirkung von TP.

Aus vielen strahlenbiologischen und -biochemischen Versuchen ist bekannt, daß der relevante Schaden, der durch Röntgenbestrahlung verursacht wird, genetischer Natur ist, d.h. an der DNS gesetzt wird (vgl. u.a. TAKAMORI et al. 1966; JANNSEN 1969; HOLZ 1970).

Wenn die Inaktivierung nach photodynamischer Behandlung ebenfalls durch eine Schädigung des Erbmaterials hervorgerufen wird, müßten bei vergleichenden Untersuchungen der Auswirkungen beider Strahlenschäden und der TP-Dunkelwirkung auf Stoffwechselleistungen ähnliche Ergebnisse zu erwarten sein.

Um dies zu prüfen, wurde die Aufnahme von radioaktivem Uracil und von radioaktiven Aminosäuren während verschiedener Wachstumsphasen in unbehandelte, oder mit Röntgenstrahlen oder TP und Licht behandelte *Saccharomyces*-zellen getestet.

Die Uracilaufnahme gilt allgemein als Maß für die RNS-Synthese der Zelle. Da die Uracil-Aufnahme durch internes Uracil empfindlich reguliert wird, ist die Aufnahme wohl abhängig vom Uracil-Bedarf der Zelle (vgl. u.a. GRENSON (1969) und dort angegebene Literatur). Es kann angenommen werden, daß dieser Bedarf während Perioden der Hauptstoffwechselaktivität der Zelle hauptsächlich durch die RNS-Synthese bestimmt wird. Auch die Aufnahme der Aminosäuren wird durch den Bedarf der Zelle an Aminosäuren bestimmt. Da Aminosäuren hauptsächlich für die Proteinbiosynthese gebraucht werden, wird angenommen, daß die Aminosäureaufnahme ein Maß für die Proteinbiosynthese darstellt.

Um die Rate der RNS- und Proteinsynthese in vivo korrekt zu ermitteln, ist es notwendig, die Syntheseprodukte nach ihrer Isolierung und Reinigung quantitativ zu bestimmen. Für erste Untersuchungen, die

einen mehr qualitativen Einblick in die durch photodynamische Behandlung verursachte Störung von Stoffwechselleistungen der Zelle geben sollen, genügt die hier verwendete Methodik.

In diesen Versuchen wird - neben dem Einfluß von Röntgenstrahlen - besonders der Einfluß von Dunkel- und Hellwirkung von TP während des Zellwachstums und der Zellvermehrung auf komplexe Stoffwechselleistungen getestet. Solche Beobachtungen erlauben ggf. Rückschlüsse auf den Hauptangriffsort der Dunkel- und Hellwirkung von TP; d.h. Aufklärung über die Frage, die Schädigung welcher Zellkomponenten zu den bei den Inaktivierungsversuchen beobachteten Absterberate führt.

Stationäre Zellen des Stammes 2200 wurden mit TP ( $c_e = 22$  oder  $44 \mu M$ ) 10 min im Dunkeln inkubiert, anschließend abzentrifugiert und in Puffer aufgenommen und bestrahlt (20 cm Abstand, 200 W). Nach der Behandlung wurden die Zellen in frisches Nährmedium gegeben und bei  $30^\circ C$  geschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten des Wachstums wurden Proben der Zellkultur kurzzeitig (15 min) mit radioaktivem Uracil oder Phenylalanin bzw. Leucin versetzt. Anschließend wurde die Menge an aufgenommener Radioaktivität pro Zelle bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch als Funktion der Wachstumszeit nach Bestrahlung aufgetragen und der Zunahme der Zellzahl während dieser Zeit gegenübergestellt.

Um die photodynamische Wirkung auf die Uracil- und Aminosäureaufnahme mit der von Röntgenstrahlen vergleichen zu können, wurden Zellen desselben Stammes mit Röntgenstrahlen bestrahlt und sonst ebenso wie oben beschrieben behandelt.

(Ähnliche Versuche mit Röntgenbestrahlung sind bereits - mit etwas anderen Methoden - von TAKAMORI et al. 1966; JANNSEN 1969; HOLZ 1970; durchgeführt worden).

#### Wachstumskurven:

Betrachtet man das Wachstum der Hefekulturen in den Abb. 28 und 29 und vergleicht die Wachstumskurven untereinander, erkennt man, daß 10 min Dunkeleinwirkung von TP ( $22, 44 \mu M$ ) nur eine sehr geringe

Wachstumsverzögerung zur Folge hat. Nach Bestrahlung wird diese mit steigender Dosis verstärkt, was sich in der zunehmenden Verlängerung der lag-Phase verdeutlicht, die in eine zunehmend längere log-Phase mit geringerer Steigung als die der Kontrolle einmündet. Je kleiner die Bestrahlungsdosen sind, desto eher wird ein Ansteigen des exponentiellen Wachstums erreicht, das dem der Kontrolle gleicht. Die stationäre Phase wird mit zunehmender Bestrahlungszeit bei einer immer verringerteren Zellzahl erreicht.

Die Abb. 26 und 27 zeigen den Verlauf der Wachstumskurven nach Röntgenbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen. Auch bei den höchsten verwendeten Dosen tritt keine stark verlängerte lag-Phase auf. Das exponentielle Wachstum nimmt bis ungefähr zur 1. Verdopplung kontinuierlich in einem gegenüber der Kontrolle verringerten Maße zu. Danach knickt die Wachstumskurve (außer nach 20 krad Bestrahlung) etwas ab. Die Zellzahl nimmt nur noch in ganz geringem Maße zu, eine 2. Verdopplung aller dieser Zellen wird nicht erreicht.

#### Uracilaufnahme:

Die Uracilaufnahme unbehandelter Proben steigt nach Inkubation der Zellen in frischem Nährmedium zu Beginn der logarithmischen Phase erst schwach, dann steil an, erreicht ungefähr in der Mitte der log-Phase maximale Werte und fällt dann sehr schnell steil ab (Abb. 26 und 28).

Nach Röntgenbestrahlung (Abb. 26) liegen die Aufnahmewerte bis etwa 2 Stunden nach Bestrahlung ähnlich wie bei der Kontrolle. Nach ca. 2 Stunden verringert sich der Anstieg der Aufnahme gegenüber dem der Kontrolle. Bei niedrigen Dosen erreicht die Aufnahme ein stark reduziertes Maximum etwa zur gleichen Zeit nach Bestrahlung wie die Kontrolle, bezogen auf die entsprechenden Wachstumskurven jedoch immer zu früheren Phasen des Wachstums. Nach höheren Strahlendosen

Wachstum, RNS-Synthese (Abb. 26) und Proteinsynthese (Abb. 27) von *Saccharomyces*zellen nach Röntgenbestrahlung.

An den Kurven ist die entsprechende Bestrahlungsdosis (krad) angegeben; K = unbestrahlte Kontrolle; RNS-Synthese: Uracil-2- $C^{14}$ ,  $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $7 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ; Proteinsynthese: Phenylalanin- $C^{14}$ ,  $5 \mu\text{Ci/ml}$ ,  $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ . (Näheres siehe Text).

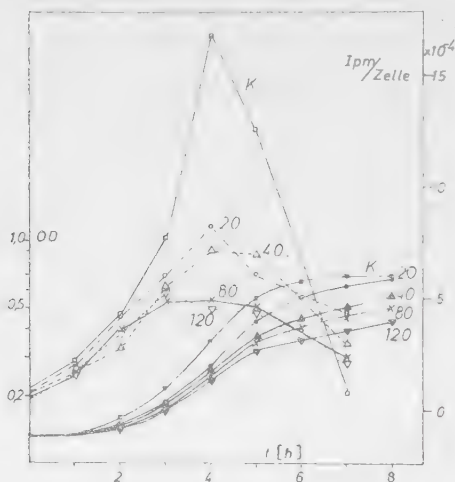
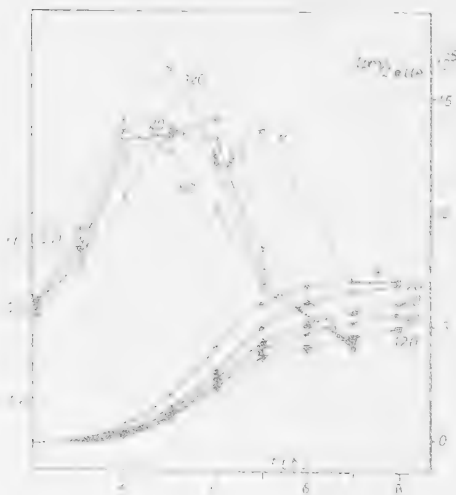


Abb. 26



Wachstum, RNS-Synthese (Abb. 28) und Proteinsynthese (Abb. 29) von tetraploiden *Saccharomyces*zellen nach Dunkel- und Helleinwirkung von TP.

An den Kurven ist die zugehörige Bestrahlungszeit (min) angegeben. K = Kontrolle; O': Dunkeleinwirkung von TP. TP Dunkelinkubation: 10 min; RNS-Synthese: TP:  $22 \mu\text{M}$ ; Uracil-2- $\text{C}^{14}$   $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $7 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ; Protein-Synthese: TP:  $44 \mu\text{M}$ , Leucin-1- $\text{C}^{14}$   $5 \mu\text{Ci/ml}$ ,  $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ . (Näheres siehe Text).

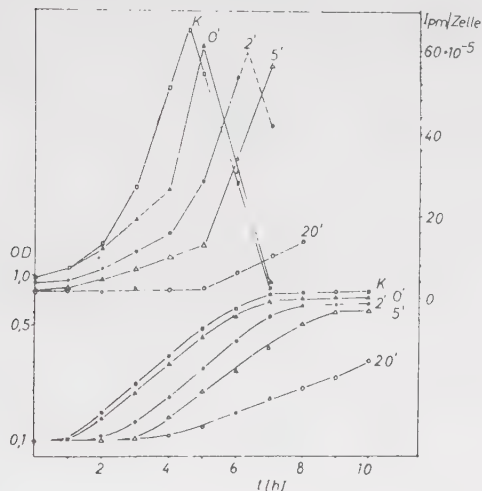


Abb. 28

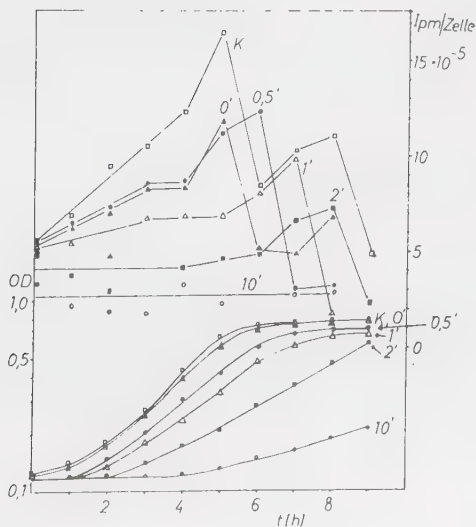


Abb. 29

wird bereits 2-3 Stunden nach Bestrahlung die Aufnahme rate nicht weiter erhöht, sondern fällt - ohne Ausbildung eines scharfen Maximums - langsam wieder ab.

Einen grundsätzlich anderen Verlauf zeigt der Einbau radioaktiven Uracils nach Dunkel- und Hellwirkung von TP (Abb. 28): Hier verschieben sich die Maxima der sehr ausgeprägten Aufnahmekurven zeitlich in gleicher Weise wie die entsprechenden Wachstumskurven, so daß bei allen Proben ungefähr in der Mitte des logarithmischen Wachstums maximale Uracilaufnahme erfolgt. Der Gesamteinbau verringert sich etwas mit zunehmender Dosis.

#### Aminosäureaufnahme:

Die Aminosäureaufnahme unbehandelter Proben zeigt einen etwas komplizierteren Verlauf als die Uracil-Aufnahme. Es treten in den einzelnen Versuchen Schwankungen der maximalen Aufnahme in bezug auf die Wachstumsphase auf, was beim Vergleich der Aufnahmekurven der Kontrollen in Abb. 27 und 29 auffällt. Manchmal erreicht der Einbau schon in frühen Phasen des exponentiellen Wachstums, manchmal erst im zweiten Drittel maximale Werte. Bei Eintreten des letzteren Falles steigt die Aufnahme in der stationären Phase wieder an.

In Abb. 27 ist der Einfluß der Röntgenbestrahlung auf die Aufnahme von radioaktivem Phenylalanin dargestellt. Auch hier wie bei der Uracilaufnahme - wird die Aufnahme in frühen Wachstumsphasen gegenüber der der Kontrolle nicht reduziert. Durch höhere Dosen scheint die Aufnahme sogar stimuliert zu werden, da sie zum Teil höhere Werte als die Kontrolle erreicht. Jedoch wird die Aufnahme eher als bei der Kontrolle abgebrochen, die Kurven fallen früher ab. Bezogen auf die entsprechenden Wachstumskurven und verglichen mit der Kontrolle erreicht die Phenylalanin-Aufnahme nach steigender Röntgendosis zu immer früheren Wachstumsphasen Maximalwerte.

Den Einfluß der Dunkel- und Hellwirkung von TP auf den Einbau von radioaktivem Leucin zeigt Abb. 29.

Im Prinzip spiegeln die Kurven denselben Einfluß von TP wider wie er bei der Uracilaufnahme beschrieben wurde: Parallelität zwischen Wachstumsverzögerung und Aufnahmemaxima, Verringerung der Gesamtaufnahme mit zunehmender Dosis.

Das zweite Maximum zu Beginn der stationären Phase wird nach TP-Einwirkung im Dunkeln vermindert und tritt nach der photodynamischen Behandlung gegenüber der Kontrolle zeitlich in dem Maße verzögert auf, wie es der Wachstumsverzögerung der jeweiligen Phase entspricht.

Bereits in früheren Arbeiten wurden die Versuchsergebnisse der RNS- bzw. Protein-Synthese nach Röntgenbestrahlung folgendermaßen gedeutet: Durch Röntgenbestrahlung der Zellen werden zwar alle Zellkomponenten etwa gleichmäßig getroffen, jedoch bewirkt ihre Schädigung erst nach sehr hohen Dosen ( $> 500$  krad) eine deutliche Verringerung der Stoffwechselleistungen, an denen diese Komponenten beteiligt sind. Nach Röntgendosen, die mehr als 99% der Zellen in ihrer Fähigkeit zur Koloniebildung inaktivieren, werden Atmung und Gärung sowie RNS- und Protein-Synthese der Zellen direkt nach Bestrahlung nur geringfügig geschädigt, manchmal sogar etwas stimuliert. Der in der DNS induzierte Schaden wird jedoch durch ständige Produktion fehlerhafter Proteine übersetzt. Sind die vorhandenen Enzyme in der Zelle durch normalen "turn over" weitgehend abgebaut, kommt es durch Nachlieferung fehlerhafter Enzyme zum Zusammenbruch von Stoffwechselprozessen an vielen Stellen in der Zelle (TAKAMORI et al. 1966; JANNSEN 1969; HOLZ 1970).

Eine ähnliche sich erst über Transkription und Translation manifestierende Schädigung wird durch den photodynamischen Effekt nicht bewirkt. Der Stoffwechsel ist bereits sofort nach photodynamischer Behandlung inaktiviert. Die lag-Phase verlängert sich mit Erhöhung der Bestrah-

lungsdosis. Es ist anzunehmen, daß dieses Verhalten besonders auf einer Schädigung der Enzyme und des Energiehaushalts der Zelle beruht. Werden Enzyme, die z. B. den Aufbau von Stoffwechselvorstufen zu wichtigen Makromolekülen der Zelle katalysieren, oxidiert oder durch Entzug metabolischer Energie funktionsunfähig gemacht, so kann durch den verminderten Bedarf dieser Stoffwechselvorstufen ihre Aufnahme über feedback Regulierung vermindert oder inhibiert werden.

Die Aufnahme der Stoffwechselvorstufen könnte aber auch direkt beeinträchtigt sein, so daß nachfolgende Syntheseschritte verlangsamt ablaufen müssen. Natürlich können auch beide Möglichkeiten zusammenreffen und sich in ihrer Wirkung ergänzen.

Es sei noch vermerkt, daß die Reduktion der Aminosäure-Aufnahme (und sekundär auch der Uracil-Aufnahme) auch zusätzlich durch Funktionsverlust der Ribosomen bewirkt sein kann.

#### 4.7 Einfluß von TP in Gegenwart und in Abwesenheit von sichtbarem Licht auf die Adenin-Aufnahme

In Kap. 4.6 wurde gezeigt, daß Inaktivierung von Stoffwechselleistungen und Wachstumsverzögerung von *Saccharomyces*zellen nach photodynamischer Behandlung parallel laufen und wahrscheinlich auf einer Schädigung von Proteinen (Enzymen) der Zelle beruhen. Dabei interessiert besonders, ob primär eine Hemmung der Aufnahme von Metaboliten zu den beobachteten Veränderungen führt. - Weiterhin wurde in Kap. 4.3 gezeigt, daß neben der Überstandsfraktion und der Ribosomenfraktion besonders die Zellwände und Membranen stark mit TP besetzt sind. Es soll nun geprüft werden, ob diese Bindung die biologische Funktionsfähigkeit dieser Zellbestandteile beeinträchtigt. Es wird vermutet, daß der photodynamische Effekt in Erythrozyten den aktiven Kationentransport (HÄNEL 1964) oder ganz allgemein die Membranpermeabilität beeinflusst (ALLISON et al. 1966; DUNCAN und BOWLER 1969).

Eine der wichtigen Aufgaben der Zellmembran ist es, den selektiven Stofftransport zwischen Zellinnerem und Außenmilieu zu gewährleisten. Man kennt grundsätzlich zwei Mechanismen, denen sich die Zelle zur Erfüllung dieser Aufgabe bedient, die erleichterte Diffusion und den aktiven Transport.

In beiden Fällen wird der zu transportierende Stoff mittels eines Transportproteins durch die Membran geschleust. Während bei der erleichterten Diffusion der Transportvorgang bei Erreichen eines Konzentrations - gleichgewichtes abgeschlossen ist, ist es für den aktiven Transport kennzeichnend, daß der transportierte Stoff gegen einen Konzentrationsgradienten in der Zelle angereichert werden kann. Zu diesem Prozess wird Energie benötigt (z. B. SITTE 1969).

In unserer Arbeitsgruppe wird zur Zeit der Transportmechanismus der Purine bei *Saccharomyces* eingehend studiert. Ein Transportmodell ist von WINTER, REICHERT und SCHOLING 1972; WINTER 1972; vorgeschlagen worden, auf das hier Bezug genommen wird.

Stationäre Zellen des Stammes 2200 wurden 2 Stunden in einem Citratpuffer, der 0,1 M an Glucose ist, gerührt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit TP versetzt (Endkonzentration: 2,5; 18; 33  $\mu$  M) und 5 min in Dunkeln gerührt.

Ein Teil wurde dann sofort, der andere nach 10 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht (200 W, 30 cm) mit radioaktiver Purinlösung inkubiert. Nach den jeweils angegebenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Menge aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Aufnahme von Zellen getestet, die mit Puffer anstelle von TP inkubiert wurden. (Bestrahlung der Kontrolle hatte keinen Einfluß auf die Aufnahme).

Der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Adenin-8- $C^{14}$  ist in Abb. 30a dargestellt. Man erkennt, daß die Aufnahme der Kontrolle bis ungefähr 10 min linear ansteigt, dann langsam abknickt und in die Sättigungsphase eintritt.

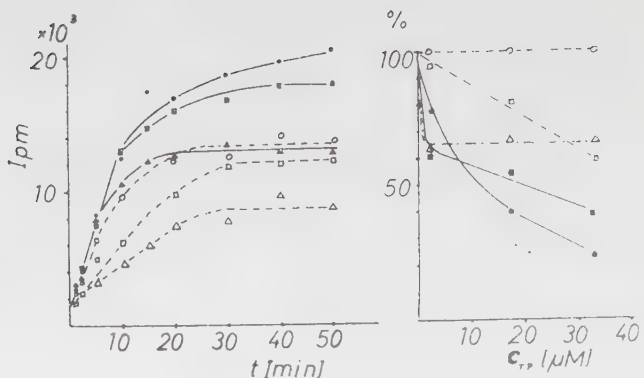


Abb. 30 Einfluß von TP auf die Adeninaufnahme in tetraploide Saccharomyceszellen.

- 30a) ●●●●● Kontrolle und Dunkeleinwirkung von TP: 25  $\mu$ M  
 ■■■■■ Dunkeleinwirkung von TP: 18  $\mu$ M  
 ▲▲▲▲▲ Dunkeleinwirkung von TP: 33  $\mu$ M

offene Symbole: Photodynamische Behandlung der mit TP behandelten Proben; 10 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht; 200 W, 30 cm.

- 30b) Prozentuale Hemmung der Aufnahmegeschwindigkeit und der Aufnahmesättigung von Adenin

100% = K ○---○ Anfangssteigung DW □---□ Sättigung DW  
 ○---○ HW ■---■ Sättigung HW  
 100% = DW △---△ Sättigung Hellwirkung

Mit derselben Anfangssteigung verläuft auch die Adeninaufnahme nach Dunkeleinwirkung der verwendeten TP-Mengen, dagegen wird die Aufnahmesättigung mit steigender TP-Konzentration immer eher erreicht, d.h. es wird insgesamt immer weniger Adenin in der Zelle akkumuliert.

Zusätzliche Bestrahlung hat ein Absinken der Anfangssteigung, die ein Maß für die Aufnahmeanfangsgeschwindigkeit ist, und eine weitere Reduzierung der Gesamtaufnahme zur Folge.

Die photodynamische Hemmung der Aufnahmeanfangsgeschwindigkeit

wird durch Erhöhung der TP-Konzentration von 2,5 bis 33  $\mu$  M verstärkt; die photodynamische Hemmung der Aufnahmekapazität wird durch Erhöhung der TP-Konzentration über 2,5  $\mu$  M hinaus nicht weiter gesteigert. Zur Veranschaulichung ist die auf die Kontrolle bezogene prozentuale Anfangssteigung und Aufnahmesättigung nach Dunkel- und Hell einwirkung von TP in Abb. 30b gesondert gezeigt.

Erst höhere als die hier verwendeten TP-Konzentrationen bewirken auch in Abwesenheit von sichtbarem Licht eine Abnahme der Aufnahmegeschwindigkeit. Nach 10minütiger Einwirkzeit wurde bei der TP-Endkonzentration von 60  $\mu$  M die Aufnahmeanfangsgeschwindigkeit gegenüber der der Kontrolle um 50% gesenkt. Zusätzliche Bestrahlung führte zur völligen Inaktivierung der Aufnahme.

Es wird deutlich, daß die Aufnahme in zwei voneinander unterscheidbare Phasen gliederbar ist - Aufnahmegeschwindigkeit und Aufnahmekapazität - zu deren Inaktivierung unterschiedliche Angriffspunkte in der Zelle zu vermuten sind.

Die Menge Adenin, die eine Zelle insgesamt bei reichhaltigem Angebot aufnimmt, wird unter normalen Bedingungen, für die die Kontrolle steht, durch den Bedarf an Adenin reguliert. Wird die Aufnahme schon früher unterbrochen, so kann das z. B. durch eine Beeinträchtigung des Energiemetabolismus der Zellen verursacht sein. Auch die Aktivität der Enzyme des "salvage pathways" oder der Biosynthese adeninhaltiger Substanzen (Nukleinsäuren) könnten gehemmt sein.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme wird (bei Konzentrationen weit oberhalb des  $K_m$ -Wertes) durch die Aktivität der am Transport und am Akkumulationsprozess beteiligten Proteine bestimmt. Reduzierte Anfangsgeschwindigkeit deutet daraufhin, daß einerseits die Transportproteine geschädigt sein können, z. B. in ihrer Affinität zum Substrat. Andererseits ist es auch möglich, daß - im Falle der Adeninaufnahme - die IMP-pyrophosphorylase nach photodynamischer Einwirkung in ihrer Funktion, die Akkumulation der Basen einzuleiten, beeinträchtigt wird und so der Efflux der Basen (Hypoxanthin) nicht ver-

hindert werden kann (vgl. Transportmodell in: WINTER 1972). Ähnlich läßt sich vielleicht auch der von WALLNÖFER und BUKATSCH (1962) nach photodynamischer Behandlung von *E. coli* Zellen beobachtete erhöhte Aminosäure-Efflux erklären.

## 5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

In Kap. 1 und 2 wurde hervorgehoben, daß unterschiedliche Ansichten bestehen, welche Zellkomponenten durch die photodynamische Behandlung von Zellen bevorzugt angegriffen werden und welche der Schädigung eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen verursachen.

In Analogie zur Wirkung von ionisierenden und UV-Strahlen wurde vermutet, daß die durch photodynamische Behandlung verursachte Schädigung einer Zelle vorwiegend durch Veränderungen an der DNS hervorgerufen wird. Diese Theorie stützen verschiedene Ergebnisse photodynamischer Untersuchungen an Prokaryonten und Phagen: z. B. die bei diesen Organismen gefundene Mutagenität des sichtbaren Lichts in Gegenwart photodynamisch aktiver Farbstoffe und die Reaktivierbarkeit photodynamischer Schäden bei Phagen. Auch die sehr gute Bindungsfähigkeit photodynamisch wirkender Farbstoffe an Nukleinsäuren, speziell an DNS, und die daraus resultierende besonders bei Bakterien nachgewiesene Beeinträchtigung der DNS-Funktion, unterstützen obige Annahme, daß der photodynamische Effekt am genetischen Material angreift; denn eine gute Farbstoffbindung an die DNS müßte bei gleichzeitiger Einwirkung sichtbaren Lichts eine erhebliche zur Dunkelwirkung zusätzliche Schädigung der DNS bewirken. Dies folgt aus Untersuchungen, in denen die selektive Zerstörung von Guanin in Nukleinsäuren nach photodynamischer Einwirkung nachgewiesen wird (vgl. Kap. 1).

Frühere Untersuchungen an *Saccharomyces*zellen und die Ergebnisse dieser Arbeit führen jedoch im Gegensatz zu obiger Theorie zu der Annahme, daß zumindest bei Hefezellen, möglicherweise auch bei ande-

ren eukaryotischen Zellen, der relevante Schaden nach photodynamischer Einwirkung nicht an der DNS gesetzt wird. Für die Schlußfolgerung sprechen folgende Ergebnisse:

Die von LOCHMANN und Mitarbeitern (1964) nachgewiesene ploidiegradunabhängige photodynamische Behandlung von homozygoten *Saccharomyces*-zellen verschiedenen Ploidiegrades (haploid bis hexaploid), ebenso die Irreparabilität photodynamischer Schäden in eukaryotischen Systemen (ITO und HIEDA 1968; KRIGER und SAKIROV 1968; LOCHMANN und STEIN 1968b), und schließlich die fehlende Mutagenität des photodynamischen Effekts bei Hefen (LOCHMANN et al 1964; MARQUARDT und LAER 1966) zeigten, daß ein erheblicher DNS-Schaden bei Hefen unwahrscheinlich ist.

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, daß TP in der Hefezelle stark akkumuliert wird und zwar in so hohem Ausmaß, daß über eine nicht ausschließende Bindung an die DNS hinaus noch sehr viele andere Zellstrukturen mit TP besetzt sein müssen (Kap. 4.2). Die Inaktivierungsrate der Zellen ist jedoch von der zunehmenden Akkumulation des Farbstoffs in der Zelle vor der Bestrahlung mit sichtbarem Licht abhängig (Kap. 4.1), was als erster Hinweis auf eine Schädigung plasmatischer Strukturen, die sich auf die Lebensfähigkeit der Zellen direkt auswirkt, gewertet werden kann.

Untersuchungen über die zelluläre Verteilung von TP *in vivo* und über das Ausmaß der TP-Bindung an einzelne Zellbestandteile zeigen, daß sowohl Membran- und Zellwandpartikel, Ribosomen als auch - wenn auch in wesentlich geringerem Maße - Proteine des Cytoplasmas den Farbstoff binden. Diese Versuche geben aber keine eindeutige Auskunft über die TP-Bindung an DNS in Hefezellen *in vivo* (vgl. Kap. 4.3). Die *in vitro* durchgeführten Bindungsversuche zeigen bei allen verwendeten Methoden, daß TP an DNS eine Innenbindung sowie eine Außenbindung eingeht. Die Dialyseversuche erlauben eine quantitative Abschätzung, daß nahezu alle möglichen Bindungsstellen *in vitro* abgesättigt wer-

den können (Kap. 4.4).

Um zu klären, ob trotz der *in vitro* erfolgenden TP-Bindung an viele plasmatische Zellkomponenten die photodynamische Inaktivierung der Zellen durch Veränderung ihrer DNS hervorgerufen wird, wurden vergleichend RNS- und Proteinsynthese der Zellen nach photodynamischer Einwirkung und nach Röntgenbestrahlung untersucht (Kap. 4.6).

In dieser Arbeit, wie schon in früheren (TAKAMORI 1966; JANNSEN 1969; HOLZ 1970), konnte nachgewiesen werden, daß die Veränderung und partielle Zerstörung der DNS die relevante durch Röntgenbestrahlung verursachte Schädigung einer Hefezelle darstellt. Der Vergleich der Syntheseleistung von *Saccharomyces*zellen nach Röntgenbestrahlung und nach photodynamischer Behandlung zeigt, daß der photodynamische Inaktivierung ein anderer Wirkungsmechanismus als der nach Röntgenbestrahlung zugrunde liegt. Sofort nach photodynamischer Behandlung wird eine Schädigung sichtbar, von der sich viele Zellen jedoch, wenn die Dosis nicht zu hoch gewählt wird, nach und nach erholen können. Die Maxima der Syntheseleistungen liegen - wie bei den unbehandelten Kontrollen - auch nach photodynamischer Behandlung, nach der das Wachstum verzögert ist, etwa in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase.

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch photodynamische Einwirkung in *vi* ein wirksamer Schaden an der DNS nicht gesetzt wird, sondern daß andere Zellkomponenten, wie z. B. die Enzyme der Zelle, geschädigt werden.

Da auszuschließen ist, daß die photodynamische Inaktivierung von Hefezellen durch einen genetischen Schaden verursacht wird, muß jetzt geklärt werden, wo in der Zelle der Hauptangriffsort des photodynamischen Effekts lokalisiert ist.

In Kap. 4.3 wurde gezeigt, daß mit der Aufnahme von TP ein sehr großer Anteil TP zuerst in den Zellwand- und Membranteilen gebunden wird. Mit Erhöhung der Innenkonzentration werden auch zunehmend Strukturen

innerhalb der Zelle, wahrscheinlich bevorzugt Ribosomen (und eventuell auch Mitochondrien) mit TP besetzt (möglicherweise erst nach Absättigung der Bindungsstellen an Zellwand und -membran). Da das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung von der Menge und von der Lokalisation des Farbstoffs in der Zelle abhängt (Kap. 4.1), ist zu vermuten, daß je nach TP-Innenkonzentration verschiedene Zellkomponenten unterschiedlich stark photodynamisch angegriffen werden. Die in Kap. 4.7 nachgewiesene Beeinträchtigung der Aufnahme und Akkumulation essentieller Nährstoffe nach Hell- und Dunkeleinwirkung schon geringer TP-Konzentrationen auf Hefezellen weist auf eine Schädigung der an diesen Prozessen beteiligten Enzymen hin. Die Verringerung der Aufnahme von Metaboliten führt zumindest zeitweise zu einer Schädigung der Zelle, die sich in einer Wachstumsverzögerung auswirken kann, wie sie in Kap. 4.6 beobachtet wurde. Unter Berücksichtigung der Farbstoffverteilung in der Zelle ist zu vermuten, daß - besonders bei höheren TP-Konzentrationen und/oder längerer Einwirkzeit von TP - neben der Verringerung der Aufnahme wichtiger Nährstoffe zusätzlich die Funktion der Ribosomen durch die photodynamische Einwirkung verändert wird.

Der Einfluß photodynamischer Behandlung auf Ribosomen wurde in einem zellfreien Protein synthetisierenden System getestet (Kap. 4.5). Es wurde nachgewiesen, daß die effektive Bindung von TP an Ribosomen (Kap. 4.5) zu einer erheblichen Inaktivierung der Proteinsynthese führt, die in Gegenwart sichtbaren Lichts noch wesentlich verstärkt wird. Dagegen sind alle anderen essentiellen Komponenten dieses Systems gegen photodynamischen Einfluß fast unempfindlich.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß der photodynamische Effekt in *Saccharomyces*-Zellen einige Zellenzyme angreift (Kap. 4.6; 4.7), erscheint es widersprüchlich, daß weder die Überstandsfraktion  $TP-H^3$  behandelter Zellen stark mit TP gebunden ist (Kap. 4.3), noch die Enzyme des zellfreien proteinsynthetisierenden Systems nach photodynamischer Behandlung in ihrer Funktion wesentlich gemindert sind (Kap. 4.5). Auffallend dagegen ist, daß gerade enzymatische Prozesse, die

funktionell an Zellstrukturen assoziiert sind, an die TP sehr gut bindet - wie an Membran- und Wandpartikel, Ribosomen, (Mitochondrien?), gehemmt werden können.

Es ist daher anzunehmen, daß - wenn nicht ausschließlich, so doch bevorzugt - die Enzyme oder Faktoren, die an Strukturen arbeiten, an die TP gut bindet, photodynamisch geschädigt werden. Wahrscheinlich gewährleistet schon ein enger nachbarlicher Kontakt die Energieübertragung zwischen TP und Enzym, das dadurch geschädigt wird.

Die Wirkung von TP auf Mitochondrien muß - besonders hinsichtlich obiger Fragestellung - noch gesondert untersucht werden, zumal die Möglichkeit einer Schädigung des Energiemetabolismus in Betracht gezogen wurde.

Es ist weiterhin anzunehmen, daß bei kurzer TP-Einwirkzeit unter Verwendung niedriger Konzentrationen hauptsächlich die an der Aufnahme essentieller Nährstoffe beteiligten Enzyme geschädigt werden. Längere Einwirkzeit und auch Verwendung höherer TP-Konzentrationen schädigen in Gegenwart sichtbaren Lichts in stärkerem Ausmaß auch Funktionen der mehr im "Zellinnern" gelegenen Zellpartikel.

Erst in sehr hohen TP-Konzentrationen, bei denen photodynamische Experimente nicht durchgeführt werden (1 mg/ml), greift TP auch das genetische Material an. Aus dem ploidiegradabhängigen Verlauf der Dunkelinaktivierung verschiedener isogener Hefestämme (haploid bis hexaploid) ist zu entnehmen, daß TP mit der DNS wahrscheinlich keine definierte Innen- und Außenbindung eingeht, sondern mit den Chromosomen derart interferiert, daß dominante Lethalmutationen induziert werden (LOCHMANN et al. 1964).

Die bei Hefezellen im Bereich niedriger TP-Konzentrationen im Dunkeln sowie in Gegenwart sichtbaren Lichts fehlende DNS-Schädigung in vivo mag darauf zurückgeführt werden können, daß die DNS in vivo durch einen Proteinmantel und komplexe Tertiärstruktur derart gut geschützt ist, daß eine Bindung des Farbstoffs nicht erfolgen kann.

So erklärt sich auch die unterschiedliche Wirkung des photodynamischen Effekts auf Viren (Phagen), Pro- und Eukaryoten: In Viren kann neben

der photodynamischen Veränderung des sehr ungeschützten genetischen Materials nur noch die Photooxidation weniger Aminosäuren des Hüllproteins die Möglichkeit der Vermehrung beeinflussen. Dagegen können bei Bakterien zusätzlich zum wahrscheinlich auch sehr ungeschützten genetischen Material noch viele andere Zellstrukturen durch den photodynamischen Effekt angegriffen werden. In Eukaryoten ist die DNS im Zellkern in Chromosomen organisiert, so daß sie durch Farbstoffe nicht so leicht angreifbar ist. So ist es zu erklären, daß die Schädigung anderer Zellkomponenten die Inaktivierung der Zelle bewirken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei Viren, Pro- und Eukaryoten ein unterschiedlicher molekularer Wirkungsmechanismus des photodynamischen Effekts vorliegt. Mit zunehmender Organisation der Organismen verlagert sich der Hauptangriffsort des photodynamischen Effekts von der DNS zu anderen Zellstrukturen. Das Ausmaß der photodynamischen Inaktivierung dieser verschiedenen Zellstrukturen bei Eukaryoten ist u. a. abhängig von der Aufnahme der verwendeten Farbstoffs in die Zelle, von seiner Bindungsfähigkeit an die Zellkomponenten und somit von seiner - konzentrationsabhängigen - Verteilung innerhalb der Zelle.

# Literaturverzeichnis

- Allison, A.C., Maquis, J.A. und Young, M.R. (1966). *Nature* 209, 87
- Altman, S. und Lerman, L.S. (1970). *J. mol. Biol.* 50, 263
- Amagasa, J. und Ito, T. (1970). *Radiat. Res.* 43, 45
- Balcarova, Z., Janovska, E., Kleinwächter, V., Koudelka, J.  
und Löber, G. (1971). *studia biophysica* 27, 205
- Bauer, W. und Vinograd, J. (1968). *J. mol. Biol.* 33, 141
- Bauer, W. und Vinograd, J. (1970a). *J. mol. Biol.* 47, 419
- Bauer, W. und Vinograd, J. (1970b). *J. mol. Biol.* 54, 281
- Baugh, P.J., Phillips, G.O. und Arthur, jr., J.C. (1966). *J. Phys. Chem.* 70, 3061
- Bellin, J.S. und Entner, G. (1966). *Photochem. Photobiol.* 5, 251
- Bellin, J.S. und Grossman, L.J. (1965). *Photochem. Photobiol.* 4, 45
- Bellin, J.S. und Oster, G. (1960). *Biochim. biophys. Acta* 42, 533
- Benassi, C.A., Scoffone, E., Galiazzo, G. und Jori, G. (1967).  
*Photochem. Photobiol.* 6, 857
- Berg, H. und Bär, H. (1967). *studia biophysica* 3, 133
- Berg, H., Heinecke, H. und Jakob, H.E. (1964). *Naturwissenschaften* 51, 444
- Berg, H. und Jungst, W. (1966). *Naturwissenschaften* 53, 481
- Blake, A. und Peacocke, A.R. (1968). *Biopolymers* 6, 1225
- Blum, H.F. (1941). new ed. (1964). *Photodynamic action and diseases caused by light*, Hafner Publ. Comp., New York
- Böhme, H. und Wacker, A. (1963). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1  
137
- Borisova, O.F., Kiselev, L.L. und Tumerman, L.A. (1963). *Dokl. Akad. Nauk., S.S.S.R.* 152, 1001
- Bradley, D.F. und Wolf, M.K. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 45, 944
- Brendel, M. (1968). *Molec. Gen. Genetics* 101, 111
- Brendel, M. und Kaplan, R.W. (1967). *Molec. Gen. Genetics* 99, 181
- Brenner, S., Barnett, L., Crick, F.H.C. und Orgel, A. (1961).  
*J. mol. Biol.* 3, 121

- Calberg-Bacq, C.M., Delmelle, M. und Duchesne, J. (1968).  
Mutation Res. 6, 15
- Chambers, R.W. und Kearns, D.R. (1969). Photochem. Photo-  
biol. 10, 215
- Chambron, J., Daune, M. und Sadron, C. (1966). Biochim. bio-  
phys. Acta 123, 306
- Chan, E.W. und Ball, J.K. (1971). Biochim. biophys. Acta 238, 31
- Chandra, P. und Wacker, A. (1966a). Z. Naturforschg. 21b, 663
- Chandra, P. und Wacker, A. (1966b). Biophysik 3, 224
- Chessin, M. (1960). Science 132, 1840
- Chrysochoos, J. und Grossweiner, L.J. (1968). Photochem.  
Photobiol. 8, 193
- Crawford, L.V. und Waring, M.J. (1967). J. mol. Biol. 25, 23
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S. und Watts-Tobin, R.J.  
(1961). Nature (Lond.) 192, 1227
- Cromwell, N.H. (1965). Am. Scientist 53, 213
- Dall'Acqua, F., Marciani, S., Caviatta, L. und Rodighiero, G.  
(1971). Z. Naturforschg. 26b, 561
- Dell'Antone, P., Colonna, R. und Azzone, G.F. (1972a). Eur. J.  
Biochem. 24, 553
- Dell'Antone, P., Colonna, R. und Azzone, G.F. (1972b). Eur. J.  
Biochem. 24, 566
- Delmelle, M. und Duchesne, J. (1967) in: Molecular Associations in  
Biology, ed. Pullman, B., Academic Press, New York,  
London, 1968, S. 299
- Dellweg, H. und Oprée, W. (1966). Biophysik 3, 241
- Drummond, D.S., Simpson-Gildemeister, V.F.W. und Peacocke,  
A.R. (1965). Biopolymers 3, 135
- Duncan, C.J. und Bowler, K. (1969). J. Cell. Physiol. 74, 259
- Eisenman, R.N., Petrusek, R. und Uretz, R.B. (1969). Biophys. J.,  
Society Abstracts, 9, A 201
- Epstein, S.S., Small, M., Falk, H.L. und Mantel, N. (1964).  
Cancer Res. 24, 855

- Fiala, S. (1949). *Biochem. Z.* 320, 10
- Finkelstein, T. und Weinstein, J. B. (1967). *J. biol. Chem.* 242, 3763
- Fitzpatrick, F. B., Pathak, M. A., Magnus, I. A. und Cuaron, W. L. (1963). *Ann. Rev. Med.* 14, 195
- Foote, C. S. (1968). *Science* 162, 963
- Foote, C. S., Wexler, S. und Ando, W. (1965). *Tetrahedron Letters* 46, 4111
- Förster, T. (1951). *Fluoreszenz organischer Verbindungen*. Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen
- Franck, J. und French, C. S. (1941). *J. Gen. Physiol.* 25, 309
- Freifelder, D., Davidson, P. F. und Geiduschek, E. P. (1961). *Biophys. J.* 1, 389
- Freifelder, D. und Uretz, R. B. (1966). *Virology* 30, 97
- Fujita, H. und Yamazaki, H. (1970). *Bull. chem. Soc. Jap.* 43, 1170
- Fuller, W. und Waring, M. J. (1964). *Ber. Bunsengesellschaft physik. Chemie* 68, 805
- Furano, A. V., Bradley, D. F. und Childers, L. G. (1966). *Biochemistry* 5, 3044
- Garvin, R. T., Julian, G. R. und Rogers, S. J. (1969). *Science* 164, 583
- Geißler, E. (1959). *Acta biol. med. germ.* 3, 96
- Geißler, E. (1967). *studia biophysica* 2, 95
- Gendon, Y. Z. (1964). *Vopre Virosol.* 9, 16
- Gersch, N. F. und Jordan, D. O. (1965). *J. mol. Biol.* 13, 138
- Ghiron, C. A. und Spikes, J. D. (1965). *Photochem. Photobiol.* 4, 13
- Gollmick, F. A. und Berg, H. (1968). *Photochem. Photobiol.* 7, 471
- Grenson, M. (1969). *Europ. J. Biochem.* 11, 249
- Grosjean, H., Wérenne, J. und Chantrenne, H. (1968). *Biochim. biophys. Acta* 166, 616
- Grossweiner, L. J. (1969). *Photochem. Photobiol.* 10, 183
- Grossweiner, L. J. (1970). *Radiation Res. Rev.* 2, 345
- Grossweiner, L. J. und Zwicker, E. F. (1963). *J. Chem. Phys.* 39, 2774

- Gurnani, S. (1968). *Photochem. Photobiol.* 8, 159
- Gurnani, S. und Arifuddin, M. (1966). *Photochem. Photobiol.* 5, 341
- Gurnani, S. und Arifuddin, M. und Augusti, K. F. (1966). *Photochem. Photobiol.* 5, 495
- Guttman, H. N. und Eisenman, R. N. (1965). *Nature (Lond.)* 207, 1280
- Hänel, A. (1964). *Acta biol. med. germ.* 12, 644
- Heilporn, V. und Limbosch, S. (1971). *Biochim. biophys. Acta* 240, 94
- Holz, H. (1970). Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- Hopkins, T. R. und Spikes, J. D. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 90
- Hopkins, T. R. und Spikes, J. D. (1970). *Photochem. Photobiol.* 12, 175
- Hunter, J. C., Woods, M. W. und Burk, D. (1965). *J. natl. Canc. Inst.* 34, 535
- Ichimura, S., Zama, M., Fujita, H. und Ito, T. (1969). *Biochim. biophys. Acta* 190, 116
- Imada, M., Inouye, M., Eda, M. und Tsugita, A. (1970). *J. mol. Biol.* 54, 199
- Ito, T., Shiroya, T., Kubo, S., Tomaru, K. und Amagasa, J. (1967). *Curr. Mod. Biol.* 1, 192
- Ito, T. und Hieda, K. (1968). *Mutation Res.* 5, 184
- Jannsen, S. (1969). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Janovska, E. und Kleinwächter, V. (1968). *Acta virol.* 12, 301
- Jori, G. und Cauzzo, G. (1970). *Photochem. Photobiol.* 12, 231
- Jori, G. und Galiazzo, G. (1971). *Photochem. Photobiol.* 14, 607
- Kapuler, A. M. (1971). *Biochim. biophys. Acta.* 238, 363
- Kautsky, H. (1937). *Biochem. Z.* 291, 271
- Kautsky, H., deBruijn, H., Neuwirth, R. und Baumeister, W. (1933). *Chem. Ber.* 66, 1588
- Kearns, D. R. und Khan, A. U. (1969). *Photochem. Photobiol.* 10, 193
- Kellmann, A. (1971). *Photochem. Photobiol.* 14, 85
- Kleinwächter, V. und Koudelka, J. (1964). *Biochim. biophys. Acta* 91, 539
- Knowles, A. (1971a). *Photochem. Photobiol.* 13, 225

- Knowles, A. (1971b). Photochem. Photobiol. 13, 473
- Knowles, A. und Mautner, G. N. (1972). Photochem. Photobiol. 15, 199
- Kramer, H. E. A. und Maute, A. (1972a). Photochem. Photobiol. 15, 7
- Kramer, H. E. A. und Maute, A. (1972b). Photochem. Photobiol. 15, 245
- Kruger, Y. A. und Sakirov, L. A. (1968). Radiobiology USSR 8, 659
- Kuwano, M., Hayashi, Y., Hayashi, H. und Kin-Ichiro, M. (1968).  
J. mol. Biol. 32, 659
- Landez, J. H., Rosko s ki, jr., R. und Coppoc, G. L. (1969). Biochim.  
biophys. Acta 195, 276
- Laskowski, W. (1962). Z. Naturforschg. 17b, 93
- Lerman, L. S. (1961). J. mol. Biol. 3, 18
- Lerman, L. S. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. US 49, 94
- Lerman, L. S. (1964). J. mol. Biol. 10, 367
- Li, H. J. and Crothers, D. M. (1969a). J. mol. Biol. 39, 461
- Li, H. J. and Crothers, D. M. (1969b). Biopolymers 8, 217
- Liersch, M. und Hartmann, G. (1965). Biochem. Z. 343, 16
- Lochmann, E. -R. (1966). studia biophysica 1, 249
- Lochmann, E. -R. (1967a). Biophysik 3, 200
- Lochmann, E. -R. (1967b). Z. Naturforschg. 22b, 196
- Lochmann, E. -R. und Micheler, A. (1972). Physicochemical pro-  
perties of nucleic acids. Bd. I. Academic Press, London  
im Druck
- Lochman n, E. -R. und Pietsch, I. (1967). studia biophysica 2, 431
- Lochmann, E. -R. und Stein, W. (1968a). Biophysik 4, 243
- Lochmann, E. -R. und Stein, W. (1968b). Biophysik 5, 78
- Lochmann, E. -R., Stein, W. und Haefner, K. (1964). Z. Naturforschg.  
19b, 838
- Lochmann, E. -R., Stein, W. und Umlauf, Ch. (1965). Z. Natur-  
forschg. 20b, 778
- Löber, G. (1971). Z. Chemie 11, 135
- Lurquin, P. und Buchet-Mahieu, J. (1971). FEBS Letters 12, 244
- Magni, G. E. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. US 50, 975

- Magni, G.E., von Borstel, R.S. und Sora, S. (1964). *Mutation Res.* 1, 227
- Marcacci, A. (1888). *Arch.Ital.Biol.* 9, 2
- Marmur, J. und Doty, P. (1962). *J.mol.Biol.* 5, 109
- Marquardt, H. und von Laer, U. (1966). *Naturwiss.* 53, 185
- Meier, H. (1963). *Die Photochemie der organischen Farbstoffe*,  
Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- Metzner, P. (1924). *Biochem.Z.* 148, 498
- Meyer, R.R., Simpson, M.V. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*  
34, 238
- Miall, S.H. und Walker, I.O. (1967). *Biochim.biophys.Acta* 145, 82
- Michaelis, L. (1947). *Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol.* 12, 131
- Micheler, A. und Lochmann, E.-R. (1971). *studia biophysica* 26, 207
- Morgan, R.S. und Rhoads, D.G. (1965). *Biochim.biophys.Acta* 102, 311
- Morita, M. und Kato, S. (1968). *Z. Naturforschg.* 23b, 931
- Nakai, S. und Saeki, T. (1964). *Genet. Res.* 5, 158
- Nicholson, B.H. und Peacocke, A.R. (1966). *Biochem.J.* 100, 50
- Okada, Y., Shizuko, A. und Tsugita, A. (1970). *J.mol.Biol.* 54, 219
- Orgel, A. und Brenner, S. (1961). *J.mol.Biol.* 3, 762
- Orlob, G.B. (1967). *Virology* 31, 402
- Oster, G.K., Bellin, J.S. Kimball, R.W. und Schrader, M.E. (1959).  
*J. Am. Chem. Soc.* 81, 5095
- Paoletti, J. und LePecq, J.B. (1971). *J.mol.Biol.* 59, 43
- Peacocke, A.R. und Skerrett, J. N.H. (1956). *Trans. Faraday Soc.* 52,  
261
- Penzer, C.R. (1970). *Biochem.J.* 116, 733
- Permogorov, V.J. und Vasilyev, V.D. (1970). *Molekul. Biol. (Mosk.)*  
4, 219
- Pritchard, N.J., Blake, A. und Peacocke, A.R. (1966). *Nature*  
(Lond.) 212, 1360
- Puglisi, P.P. (1967). *Mutation Res.* 4, 289
- Raab, O. (1900). *Z. Biol.* 39, 524
- Reichert, U. (1969). *Dissertation, Freie Universität Berlin*

- Ritchie, D.A. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 720
- Riva, S.C. (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 606
- Santamaria, L. (1960). in *Recent Contributions to Cancer Research in Italy*, Suppl. to "Tumori", p.p. 167-287, Ambrosiana, Milano
- Santamaria, L. (1962). *Bull. Soc. Chim. Belges* 71, 889
- Santamaria, L., Giordano, G.G., Alfici, M. und Cascione, F. (1966). *Nature (Lond.)* 210, 824
- Sastry, K.S. und Gordon, M.P. (1966). *Biochim. biophys. Acta.* 129, 428
- Schenck, G.O. (1956). *Naturwiss.* 43, 71
- Schenck, G.O. und Koch, E. (1960). *Z. Elektrochem.* 64, 170
- Schwab, R., Sebald, M. und Kaudewitz, F. (1971). *Molec. Gen. Genet.* 110, 361
- Simon, M.I. und Vunakis, H. van (1962). *J. mol. Biol.* 4, 488
- Simon, M.I., Grossman, L. und Vunakis, H. van (1965). *J. mol. Biol.* 12, 50
- Singer, B. und Fraenkel-Conrat, H. (1966). *Biochemistry* 5, 2446
- Sitte, P. (1969). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 82, 329
- Song, P. und Kurtin, W.E. (1969). *Photochem. Photobiol.* 10, 211
- Spikes, J.D. (1968). In: *Photophysiology*, Vol. III, p.p. 33-64, (A.C. Giese ed.), Academic Press, New York, London
- Spikes, J.D. (1969). *Biophys. J.* 9
- Spikes, J.D. (1970). *Biophys. J.* 10
- Spikes, J.D. und Livingston, R. (1969). In: *Advances in Radiation Biology*, Vol. III, p.p. 29-121 (L. G. Augenstein et al. ed.), Academic Press, New York und London
- Spikes, J.D. und Straight, R. (1967). *Ann. Rev. Phys. Chem.* 18, 409
- Steinert, M. (1969). *Exp. Cell Res.* 55, 248
- Stone, A.L. und Bradley, D.F. (1961). *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 3627
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E. und Inouye, M. (1966). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 77
- Sussenbach, J.S. und Berends, W. (1963). *Biochim. biophys. Acta* 76, 1
- Sussenbach, J.S. und Berends, W. (1964). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 16, 263

- Sussenbach, J. S. und Berends, W. (1965). *Biochim. biophys. Acta* 95, 184
- Szybalski, W. (1967). *Radiat. Res. Suppl.* 7, 147
- Takamori, Y., Lochmann, E.-R. und Laskowski, W. (1966). *Z. Naturforsch.* 22b, 960
- Takesada, H., Saito, E., Fujita, H., Suzuki, K. und Wada, A. (1970). *Bull. chem. Soc. Japan* 43, 181
- Tao, T., Nelson, J. H. und Cantor, C. R. (1970). *Biochemistry* 9, 351
- Tappeiner, H. von und Jodlbauer, A. (1904). *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 80, 427
- Tappeiner, H. von und Jodlbauer, A. (1907). *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*, Vogel, Leipzig
- Tappen, O. (1966). *Frankf. Rundschau* 29. 8. 1966, S. 5
- Teresa, G. W., Teresa, N. L. und Melius, P. (1965). *J. Microbiol.* 11 1028
- Träger, L., Türck, G., Ishimoto, M. und Wacker, A. (1964). *Biophysik* 1, 403
- Tsugita, A., Okada, Y. und Uehara, K. (1965). *Biochem. biophys. Acta* 103, 360
- Tubbs, R. K., Ditmars, jr., W. E. und Van Winkle, Qu. (1964). *J. mol. Biol.* 9, 545
- Uehara, K., Mizoguchi, T. und Okada, Y. (1964). *J. Biochem. (Tokio)* 55, 685
- Uehara, K., Mizoguchi, T., Okada, Y. und Kuwashima, J. (1966a). *J. Biochem. (Tokio)* 59, 433
- Uehara, K., Mizoguchi, T. und Hosomi, S. (1966b). *J. Biochem. (Tokio)* 59, 550
- Uehara, K., Mizoguchi, T., Okada, Y. und Umemoto, J. (1966c). *J. Biochem. (Tokio)* 59, 556
- Uttech, K. (1972). *Dissertation, Freie Universität Berlin*
- Uttech, K. und Lochmann, E.-R. (1972). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, im Druck

- Vorst van de, A. (1971). Photochem. Photobiol. 13, 321
- Vorst van de, A. und Lion, Y. (1971a). Biochim. biophys. Acta 238, 417
- Vorst van de, A. und Lion, Y. (1971b). Biochim. biophys. Acta 246, 421
- Wacker, A., Türck, G. und Gerstenberger, A. (1963). Naturwiss. 50, 377
- Wallnöfer, P. und Bukatsch, F. (1962). Zbl. Bakteriologie, II. Abt. 115, 238
- Waring, M. (1964). Biochim. biophys. Acta 87, 358
- Waring, M. (1968). Nature (Lond.) 219, 1320
- Waskell, L. A., Sastry, K. S. und Gordon, M. P. (1966). Biochim. biophys. Acta 129, 49
- Weil, L. und Seibles, T. S. (1955). Arch. Biochem. Biophys. 54, 368
- Weil, L., James, S. und Burchert, A. R. (1953). Arch. Biochem. Biophys. 46, 266
- Weil, L., Seibles, T. S. und Herskovits, T. T. (1965). Arch. Biochem. Biophys. 111, 308
- Wérenne, J., Grosjean, H. und Chantrenne, H. (1966). Biochim. biophys. Acta 129, 585
- Winter, M. (1972). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Winter, M., Reichert, U. und Scholing, L. (1972). in Vorbereitung
- Yamabe, S. (1969). Arch. Biochem. 130, 148
- Yamagata, H. und Uchida, H. (1969). J. mol. Biol. 46, 73
- Zügel, M., Förster, Th. und Kramer, H. E. A. (1972). Photochem. Photobiol. 15, 33
- Zwicker, E. F. und Grossweiner, L. I. (1963). J. Phys. Chem. 67, 549
- Zylber, E., Vesco, C. und Penman, S. (1969). J. mol. Biol. 44, 195
- Molecular Associations in Biology (1968), ed. Pullman, B. Academic Press New York, London
- Interaktionen bei Biopolymeren (1970). studia biophysica, Bd. 24/25

## Lebenslauf

Am 28. 8. 1946 wurde ich als einziges Kind des Kaufmanns Franz Micheler und seiner Ehefrau Gertraud, geb. Recke, in Berlin geboren.

Nach 6 Jahren Volksschule besuchte ich ab 1959 die Marie-Curie-Oberschule, an der ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1966 wurde ich an der Freien Universität Berlin für das Fach Zoologie immatrikuliert, im Sommersemester 1969 legte ich die Vordiplomprüfung ab. Seit dem 1. 2. 1970 bin ich als studentische Hilfskraft beim Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik beschäftigt.

Die vorliegende Arbeit wurde ab Januar 1970 in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie unter Anleitung von Prof. Dr. E. -R. Lochmann angefertigt.









